



TITLE:

芳香族化合物をアクセプタとする プレニルトランスフェラーゼの構 造および機能解析

AUTHOR(S):

矢崎, 一史

CITATION:

矢崎, 一史. 芳香族化合物をアクセプタとするプレニルトランスフェラーゼの構造および機能解析. 2002

ISSUE DATE:

2002-03

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/85014>

RIGHT:

学術雑誌掲載論文の抜き刷り、出版社に著作権許諾が得られていないため未掲載。

芳香族化合物をアクセプタとするプレニル トランスフェラーゼの構造および機能解析

(12680589)

平成12年度～平成13年度科学研究費助成金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成14年3月



研究代表者 矢崎 一史

(京都大学大学院生命科学研究科助教授)

は し が き

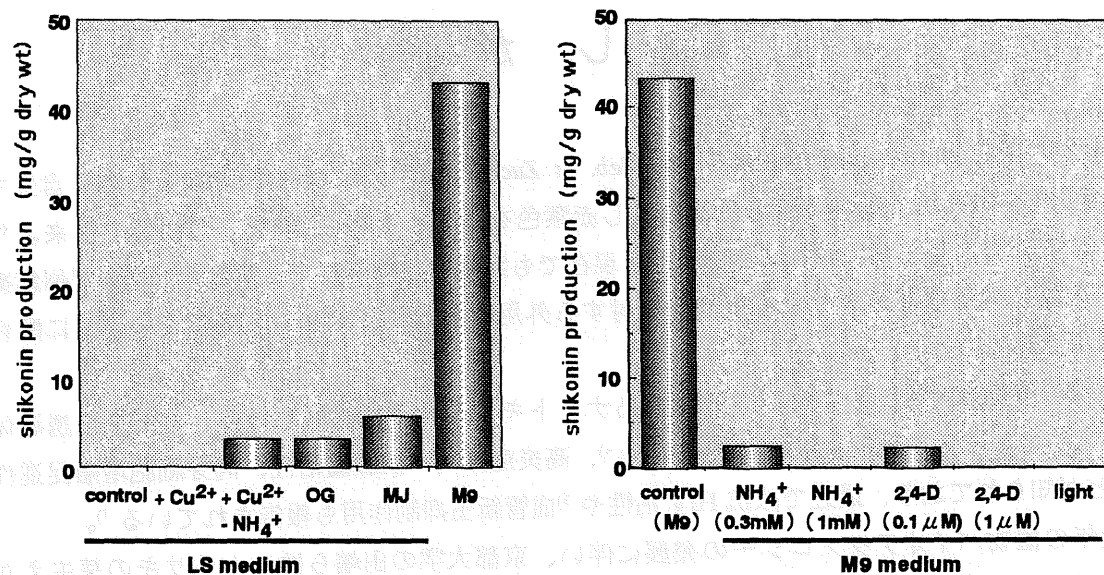
ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) は、中国、朝鮮、および日本に自生する多年性草本であり、根部に赤色色素を有し赤紫色を呈するため、「紫根」の漢名で古来より薬用、また染料として利用されてきた¹⁾²⁾。現在でも紫根を主成分とする紫雲膏 (華岡青州創薬) は、火傷、凍傷などの種々の皮膚疾患に対する外用薬として、あるいは痔疾用の坐薬に配合され繁用されている。

紫根の有効成分は、シコニンと呼ばれるナフトキノン系赤色色素を母核としたその誘導体であるとされ、その生理活性には抗菌作用³⁾⁴⁾、高炎症作用、抗腫瘍活性、肉芽細胞増殖促進作用⁵⁾などが知られており、最近では抗 HIV 活性や⁶⁾血管新生抑制作用も報告されている⁷⁾。

近年の植物バイオテクノロジーの発展に伴い、京都大学の田端らは、ムラサキの芽生えから IAA 含有寒天培地で赤色細胞塊を選抜することにより、高いシコニン生産性を示すカルス株 (Strain M18) を確立した⁸⁾。これにより植物体の根皮のみではなく、培養細胞においてもシコニンの生産を行うことが可能となった。この細胞体を用いて、三井石油化学により、植物培養細胞によるシコニンの大量生産系の確立が試みられ、細胞増殖用培地とシコニン生産を至適化した液体培地 (M9 培地) を組み合わせる二段階培養法が開発された⁹⁾。この新規な生産培地にて培養されたムラサキ細胞は、最高で乾重量あたり 20%ものシコニン生産を可能とし、この系は植物培養細胞を用いた物質生産系として世界で最初の実用化例となった¹⁰⁾。

M9 培地開発の過程で、シコニン生合成は様々な化学的因子によって制御されることが分かってきた。即ち Cu^{2+} 、kinetin⁸⁾、ジャスモン酸¹¹⁾、酸性多糖¹²⁾¹³⁾などによって促進され、逆に $\text{NH}_4^{+9)}$ 、2,4-D⁸⁾などに抑制されることがこれまでに報告されている (Fig. 1-1)。従って M9 培地は通常ムラサキ培養細胞の継代培養に用いている Linsmaier-Skoog's (LS) 培地に比べ、 Cu^{2+} 濃度が約 10 倍高く、窒素源としては NH_4^{+} 性窒素を全く含まず NO_3^{-} のみを含むように設計されており、他の補助要因とも合わせてシコニンの大量生産を最も効率良く誘導できる培地である。この物質は生合成後細胞外に顆粒として放出されるため、M9 培地を用いたシコニン生産においては培地及び細胞表面が赤色を呈するという特徴を有する (Fig. 1-2)。一方 LS 培地は、細胞増殖を目的とした培地であり、この培地中で培養される細胞のシコニン合成はほぼ完全に抑制されている。

これまでに知られる、シコニン生合成上最も優先的な抑制因子の一つは光であり、シコニン生産は M9 培地にあっても、光照射によって特異的かつ強力に阻害される。この現象は、光を要求するフラボノイドなどの生合成とは全く逆の性質であり、二次代謝の負の制御の好適なモデル系であると考えられる。なお、その阻害効果は青色光が最も強いことが分かっており⁸⁾、本二次代謝の光抑制に何らかの形でフラビン色素が関与していることも示唆されている¹⁴⁾。



シコニン生産誘導因子

シコニン生産抑制因子

Fig. 1-1 シコニン生産に対する調節因子の影響

左図：銅イオン、メチルジャスモン酸（MJ）、オリゴガラクトツロン酸（OG）によるシコニン生産の促進作用。コントロールのLS培地に、終濃度1.2 μMの銅イオンや10 μMのメチルジャスモン酸（MJ）、または100 μg/mlのオリゴガラクトツロン酸（OG）を加えたもの。アンモニウムイオン除去培地では、替りに同濃度の硝酸イオンで補完した。

右図：光、アンモニウムイオンおよび2,4-Dによるシコニン生産の抑制作用。コントロールのM9培地に濃度を振り分けてそれぞれの因子を加えた。

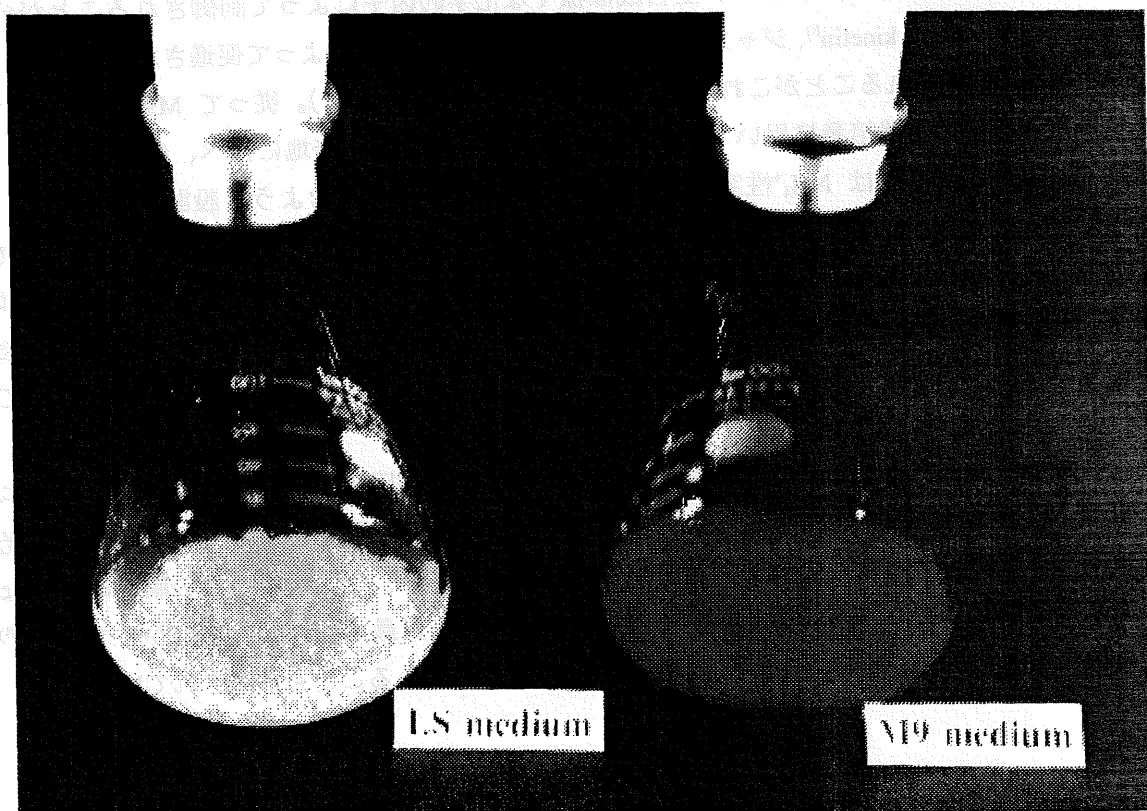


Fig. 1-2 LS 及び M9 培地におけるシコニン生産

シコニンの生合成経路は、ムラサキカルスを材料としたトレーサー実験により解明されてきた。要約すると、シキミ酸経路由来の *p*-hydroxybenzoic acid (PHB) 及びメバロン酸経路産物である geranyldiphosphate (GDP) のカップリングによって、*m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid (GBA) が生じ、さらにそれから geranylhydroquinone といった中間体を経てナフタレン環が形成され、数段階の酸化反応を経てシコニンが合成される¹⁵⁾ (Fig. 1-3)。

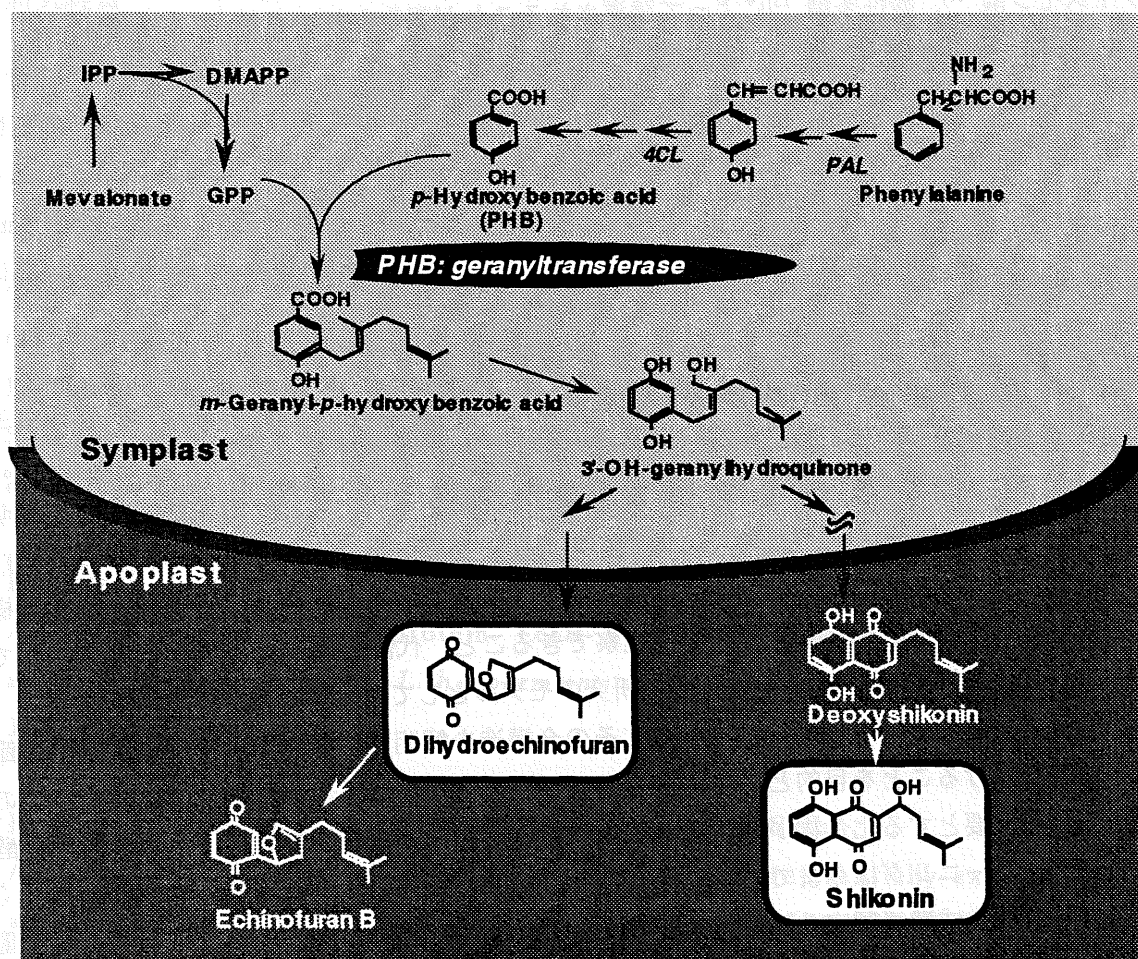


Fig. 1-3 ムラサキにおけるシコニン生合成経路

これらの生合成経路に関わる酵素の生化学的研究も、京都大学の田端らや Tübingen 大学の Heide らのグループを中心に進められてきた。現在のところ、PHB 生合成に関与する phenylalanine ammonio-lyase (PAL)¹⁶⁾、4-coumarate: CoA ligase (4CL)¹⁷⁾、PHB: glucosyltransferase¹⁸⁾、PHB: glucosidase¹⁹⁾、また GPP の生合成に関与する HMG-CoA reductase²⁰⁾、GPP synthase²¹⁾、さらには PHB と GDP のカップリングを触媒する PHB: geranyltransferase (GT)²²⁾ の存在が報告されている。

この一連の経路は PHB と GDP のカップリング反応、つまり GT による反応段階を境に、その性質や制御条件を異にする。これ以前の反応経路は、少なくとも PHB 生合成に関して、光照射下/暗黒下、LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けることなく酵素反応が進

み、また生合成中間体はほとんどの場合可溶性で、これに関する酵素群も可溶性であるとされている。これに対してカップリング反応は暗黒下でなければ進まず、これ以降の中間体は疎水性のため、関与する反応は全て ER 及びそれに由来する膜系において行われるとされている。またそれに従い、GT 以降の酵素は膜結合性であると予想でき、実際にこれまでに検定されている活性は全てミクロソーム画分で確認されている²³⁾。そこで、この境界に位置する GT に関して、現在までに様々な研究が行われてきた。

ムラサキ培養細胞における本酵素活性は、光¹⁶⁾、2,4-D、 NH_4^+ によって抑制され、 Cu^{2+} 、ジャスモン酸¹¹⁾、酸性多糖¹³⁾によって誘導されることが報告されている。この調節は、シコニン生合成に対する先述の調節とほぼ同調しており、様々なシコニン生産制御に対するこの GT の担う役割は極めて大きいことが指摘されている。またその生化学的解析より、GT の活性には補酵素として Mg^{2+} などの 2 価イオンを要求すること、細胞内局在場所は小胞体膜上であること²⁴⁾、基質として PHB と GPP にのみ高い特異性があること、本酵素の部分精製による K_m 値の測定²⁵⁾などが報告されてきた。しかしその単一蛋白質としての精製は、現在まで成功には至っていない。

植物の二次代謝産物には、花粉媒体の誘寄、環境や食害に対する防御（反応）といった生物の意義が知られる一方、有用天然物質として我々の生活の中で様々な形で利用されている。これらの植物における二次代謝産物の生産調節機構を解明することは、その生合成経路を解明することと同様に学術的重要性が高く、植物科学の研究分野では重要課題となっている。GT の活性調節に依存するシコニン生合成調節は、一つの遺伝子の発現が様々な因子によって多様に調節されていること、最終産物が肉眼で観察できること、代謝経路物質の検出が確立されていること等の利点があることから、二次代謝研究のモデルとして適していると思われる。

本研究ではこの GT をクローニングしてその全構造を解明し、様々な因子による発現調節機構の解明に繋げることを目的としている。また二次代謝産物には、生合成段階で芳香族環のプレニル化を必要とする化合物が数百種確認されているが、これらのプレニル化を触媒する酵素遺伝子のクローニングは今まで報告がない。そこで、本酵素のクローニングは、これら多くの代謝産物の生合成酵素同定への足掛かりとなるであろうことも、本研究の位置づけとして重要と考える。

さらに、ムラサキのインタクト植物においてシコニン誘導体は、根の外皮層(コルク層ならびに表皮細胞)のみに蓄積するが、この器官特異的な二次代謝産物の蓄積が、何によるものかは長い間の議論の対象であった。今回、*in situ hybridization* により、グラニルトランスフェラーゼなどシコニン生合成の鍵酵素類の発現を組織レベルで詳細に解析し、その遺伝子発現様式が二次代謝産物蓄積の組織特異性に対して果たす役割を検定することも目標とした。

研究組織

研究代表者 : 矢崎一史 (京都大学大学院生命科学研究科助教授)

(研究協力者 : 國久美由紀

藤崎隆広

山本浩文

佐藤文彦)

研究経費

平成 12 年度 1,600 千円

平成 13 年度 1,300 千円

計 2,900 千円

研究発表

(1) 学会誌等

K. Touno, H. Harada, K. Yoshimatsu, K. Yazaki, and K. Shimomura

Shikonin derivative formation on the stem of cultured shoots in *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Cell Reports, **19** (11), 1121-1126 (2000).

K. Yazaki, H. Matsuoka, K. Shimomura, A. Bechthold, and F. Sato

A novel dark-inducible protein LeDI-2 and its involvement in root-specific secondary metabolism in *Lithospermum erythrorhizon*. Plant Physiol., **125** (4), 1831-1841 (2001).

K. Yazaki, N. Shitan, H. Takamatsu, K. Ueda, and F. Sato

A novel *Coptis japonica* multidrug resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. J. Exp. Botany, **52** (357), 877-879 (2001).

K. Yazaki

Root-specific production of secondary metabolites: regulation of shikonin biosynthesis by light in *Lithospermum erythrorhizon*. (Review) Natural Medicines, **55** (2), 49-54 (2001).

H. Yamamoto, A. Yato, K. Yazaki, H. Hayashi, G. Taguchi, and K. Inoue

Enhancement of secondary metabolite productions in various plant cell cultures by co-cultivation with cork. Biosci. Biotech. Biochem., **65**(4), 853-860 (2001).

H. Hayashi, P. Huang, K. Ioue, N. Hiraoka, Y. Ikeshiro, K. Yazaki, S. Tanaka, T.

Kushiro, M. Shibuya, and Y. Ebizuka

Molecular cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica* involved in bryonolic acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.*, **268** (23), 6311-6317 (2001).

K. Yazaki, M. Kunihiya, T. Fujisaki, and F. Sato

Geranyl diphosphate: 4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*: Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **277** (8), 6240-6246 (2002).

(2) 口頭発表

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史、ムラサキにおける 4-ヒドロキシ安息香酸プレニルトランスフェラーゼのクローニング、日本農芸化学会 2000 年度大会、東京都、2000 年 3 月

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史、芳香族をアクセプタとするプレニルトランスフェラーゼのクローニングと発現解析、日本植物生理学会 2000 年度大会、名古屋、2000 年 3 月

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史、ムラサキにおける 4-ヒドロキシ安息香酸プレニルトランスフェラーゼのクローニングと発現の解析、日本植物細胞分子生物学会 2000 年度大会、静岡、2000 年 8 月

p-Hydroxybenzoic acid を基質とするプレニルトランスフェラーゼのクローニングとムラサキにおける発現解析、日本生薬学会 2000 年度大会、所沢、2000 年 9 月

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史、ムラサキにおける 4-ヒドロキシ安息香酸プレニルトランスフェラーゼ (LePPT-2) のクローニングと発現機能解析、日本分子生物学会 2000 年度大会、神戸、2000 年 12 月

國久美由紀、佐藤文彦、矢崎一史、芳香族化合物を基質とするプレニルトランスフェラーゼの構造と機能解析、日本植物生理学会 2001 年度大会、福岡、2001 年 3 月

矢崎一史、國久美由紀、佐藤文彦、酵母における植物 4-ヒドロキシ安息香酸：ゲラニルトランスフェラーゼの発現と機能解析、日本農芸化学会 2001 年度大会、京都、2001 年 3 月

ムラサキにおけるプレニルトランスフェラーゼ cDNA のクローニング

2-1 PCR 法によるプレニルトランスフェラーゼの cDNA 断片の増幅

(目的)

本研究では、シコニン生合成経路上のゲラニルトランスフェラーゼ (GT) をクローニングするために、GT と類似の反応を触媒するユビキノン生合成酵素のアミノ酸配列を利用して、PCR によるクローニングを試みることにした。まずムラサキの持つ *p*-ヒドロキシ安息香酸：ポリプレニルトランスフェラーゼ (PHB: PPT、以後 PPT と仮称) と相同性のある蛋白質全てを対象とした探索を試みた。複数のクローンが得られた場合、発現パターンがシコニン生産のそれと対応しているクローンを GT クローンとして解析することにした。

(結果)

現在までにクローニングが報告されている PPT 遺伝子は、大腸菌 (*ubiA*)^{26) 27)}、出芽酵母 (*COQ2*)^{28) 29)}、分裂酵母 (*ppt1*)³⁰⁾からのもののみであり、これらはミトコンドリアに局在して呼吸鎖の電子伝達を担うユビキノンの生合成を行っていると考えられる。アラビドプシスには、ゲノムプロジェクトにより配列の決定された類似遺伝子 *AePPT* が存在するが、植物二次代謝系には参考にできる遺伝子はない。

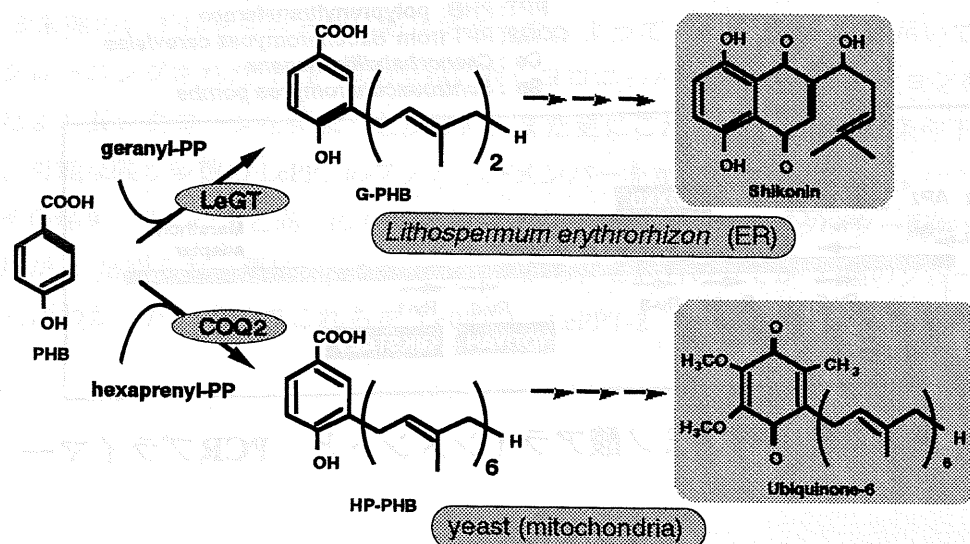
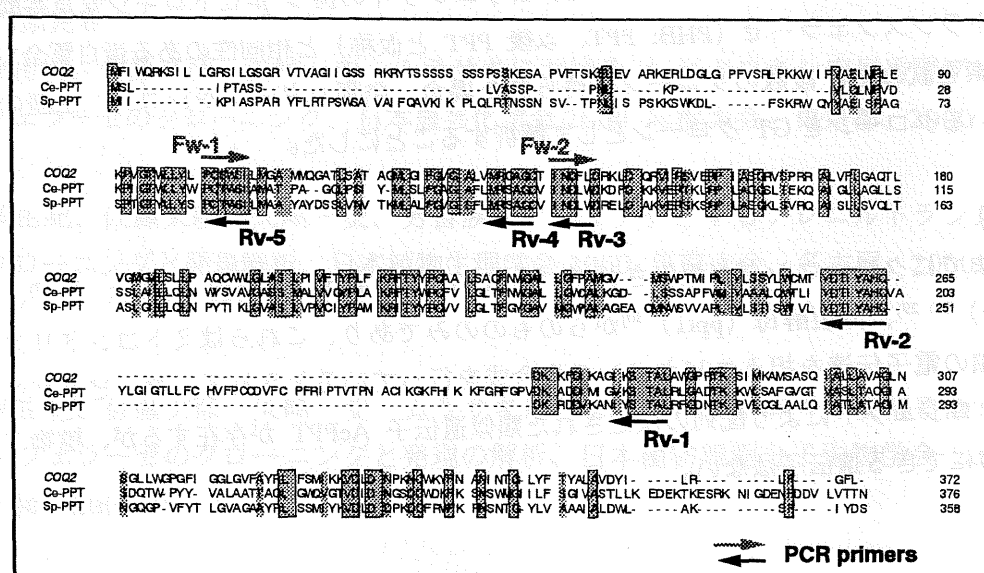


Fig. 2-1 シコニン及びユビキノン生合成経路における GT と *COQ2* 産物の触媒反応

しかし、これらの酵素と GT とは、局在や基質、代謝系こそ異なるが、触媒する反応は Fig. 2-1 に示すように非常に類似しているため、少なくとも基質認識部位やその周辺において共通の配

列を保有しているのではないかと推察した。そこで真核生物の PPT (EST クローンも含む) を広く検索してマルチアラインメントを作成し、そのアミノ酸保存領域から数種のプライマーを設計して (Fig. 2-2)、ムラサキの cDNA library を鋳型に PCR 法により PPT の増幅を行った。cDNA library は、M9 培地に移植後、暗黒下で培養 4 日目のムラサキ培養細胞 M18-1 株から total RNA を抽出し (QIAGEN RNeasy plant mini kit)、さらに mRNA purification kit (Amersham-pharmacia) により mRNA を精製して、Marathon cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用い逆転写、そして cDNA 末端へのアダプター (AP) 付加を行って作成した。



PPT: PHB: polyprenyltransferase
COQ2: PPT from *Saccharomyces cerevisiae*
Ce : *Caenorhabditis elegans*
Sp : *Schizosaccharomyces pombe*

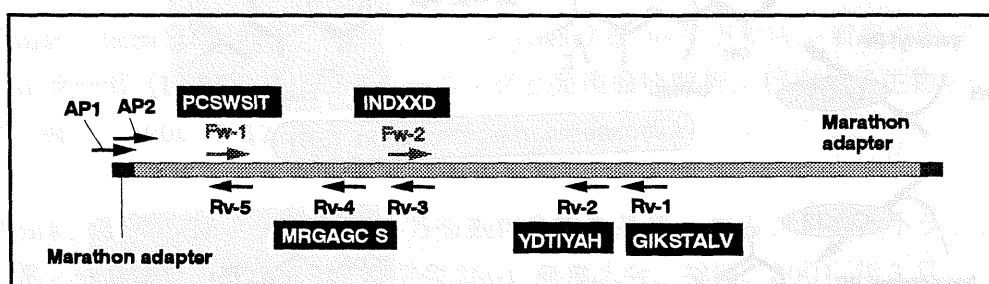


Fig. 2-2 真核生物 PPTアミノ酸アラインメントと PCRプライマー

Fig. 2-3 に示すような様々なプライマーの組み合わせで nested PCR を行ったところ、全てを通じて非常にスメアーなバンドが増幅された。これらの DNA 断片を pT7Blue T-vector (Novagen) にサブクローニングし、ランダムに 35 クローンをシークエンシングした。これらの配列を

Genome Net (DDBJ) において検索した結果 (Table 1)、1 クローンが真核生物の PHB: PPT、特に yeast のユビキノン合成酵素 *COQ2* と高い相同性 (局所的にアミノ酸レベルで約 50%) を持っていることが判明した。これを LePPT と仮称し、ムラサキの GT の cDNA 候補として研究を進めることにした。

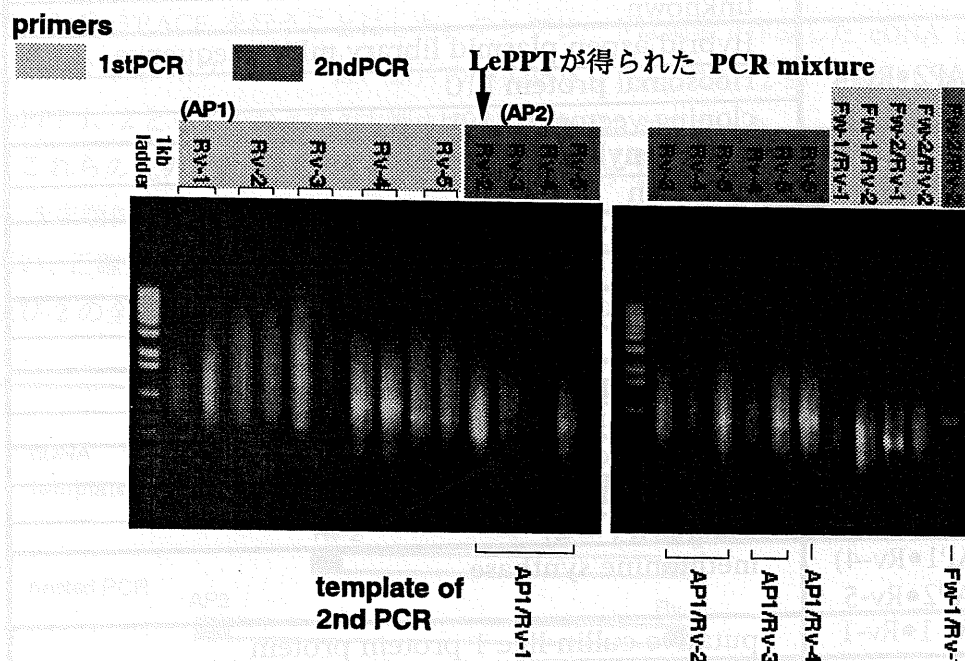


Fig. 2-3 Nested PCR 産物の電気泳動写真

本 DNA は全長約 0.6kbp の増幅断片で、両端にプライマー Rv-2 の配列を持っており、5'および 3'末端のいずれをも含まない断片であった。よってこれをプローブに用いて、T-vector にサブクローニングされた PCR 産物全般に対しコロニーハイブリダイゼーションを行い、5'末端を含むより長いクローンを得ようと試みた。また更にこれを non-stringent 条件下で行うことにより、可能な限り多数の LePPT のファミリーメンバーを単離しようと考えた。

その結果、プローブと同一の 0.6kbp 断片が更に 3 個、5'末端のアダプター配列まで含む 0.8kbp 断片が 5 個得られ、更にシーケンシングから、これらの全てが 2 種のグループに分類できることがわかった。そこでこれらを LePPT-1、LePPT-2 として、それぞれに解析を行うことにした。

Table 1 PCR産物の Gene net検索結果

() 内はテンプレートとした 1st PCRのprimer pair

PCR	primers	identity
1st	AP1•Rv-3	DnaJ-like 2 protein
	AP2•Rv-3	malate dehydrogenase
		unknown
	AP2•Rv-4	Hybrid aspen plasmid library mRNA sequence
		ribosomal protein L10
		cloning vector pTZ19U
2nd	(AP1•Rv-1) AP2•Rv-2	polyprenyltransferase-like protein
	(AP1•Rv-1) AP2•Rv-4	unknown
		hydroxyacylglutathione hydrolase
	(AP1•Rv-1) AP2•Rv-5	unknown (× 2)
		cloning vector pTZ19U (× 2)
	(AP1•Rv-2) AP2•Rv-4	unknown
		ribosomal protein L10
	(AP1•Rv-2) AP2•Rv-5	mitochondrial processing peptidase
		dihydrolipoamide dehydrogenase
		A. thaliana putative laccase?
	(AP1•Rv-4) AP2•Rv-5	unknown (× 2)
		methionine synthase
1st	Fw-1•Rv-1	putative cullin-like 1 protein protein
	Fw-1•Rv-2	extensin-like protein
		brassinosteroid insensitive 1 protein?
		microsatellite DNA, GT-repeat?
		cloning vector pTZ19U
		unknown (× 2)
	Fw-2•Rv-1	methionine synthase
		ubiquitin activating enzyme E1 protein
2nd	(Fw-1•Rv-1) Fw-2•Rv-2	A.thaliana hypothetical protein T29F13.11
		A.thaliana putative protein protein (× 4)
		chloroplast RNA polymerase protein (× 2)
		epoxide hydrolase
		Human p150, reverse trascripthase like protein
		YtcJ protein?
		cloning vector pTZ19U (× 2)
		unknown (× 2)

2-2 RACE 法による LePPT cDNA の全長の単離

(目的)

前項で得られた LePPT-1 及び 2 は、翻訳開始コドンもしくは終始コドンを含んでいなかった

ため、これらの全配列を得てそれぞれにアミノ酸構造解析を行い、更にはその機能を明らかにするための強制発現実験を行う材料とすることにした。

(結果)

LePPT の全長クローニングに際し、LePPT-1 の複数クローンにおいては 5'末端に開始コドンが見られたが、LePPT-2 には見られなかったため、LePPT-2 の 5'RACE および LePPT-1、2 両クローンの 3'RACE を行うことにした。テンプレートは前節で作成した cDNA library、5'RACE および 3'RACE 用プライマーは、断片の中央あたり (Fig. 2-4、2-5) で設計した。RACE の結果、LePPT-1、2 ともに 5'および 3'末端までの配列が明らかになった。

これらの配列を参考に更に全長 cDNA を増幅するためのプライマーペアを作成した。すなわち 5'末端側はアダプター配列を除き、3'末端側は polyA 配列を除いた 2 組のプライマーペアを用い、正確性の高い Pfu polymerase (Promega) によって cDNA library をテンプレートに、LePPT-1 及び-2 の全長をそれぞれ改めて増幅した。

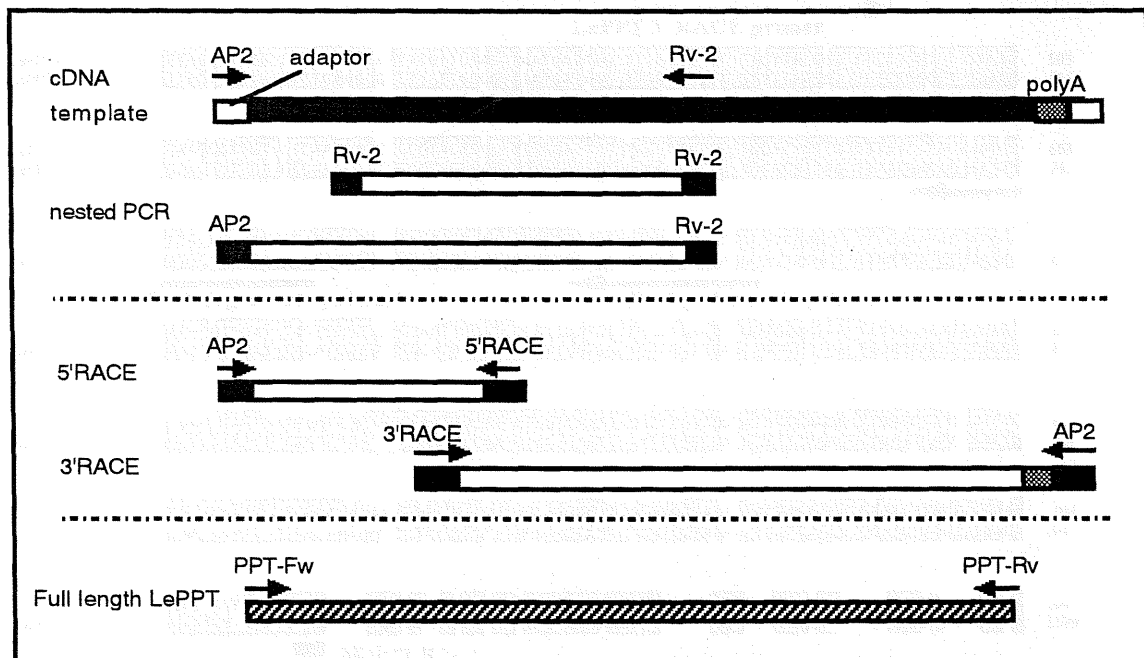


Fig. 2-4 LePPT全長クローニングの概要

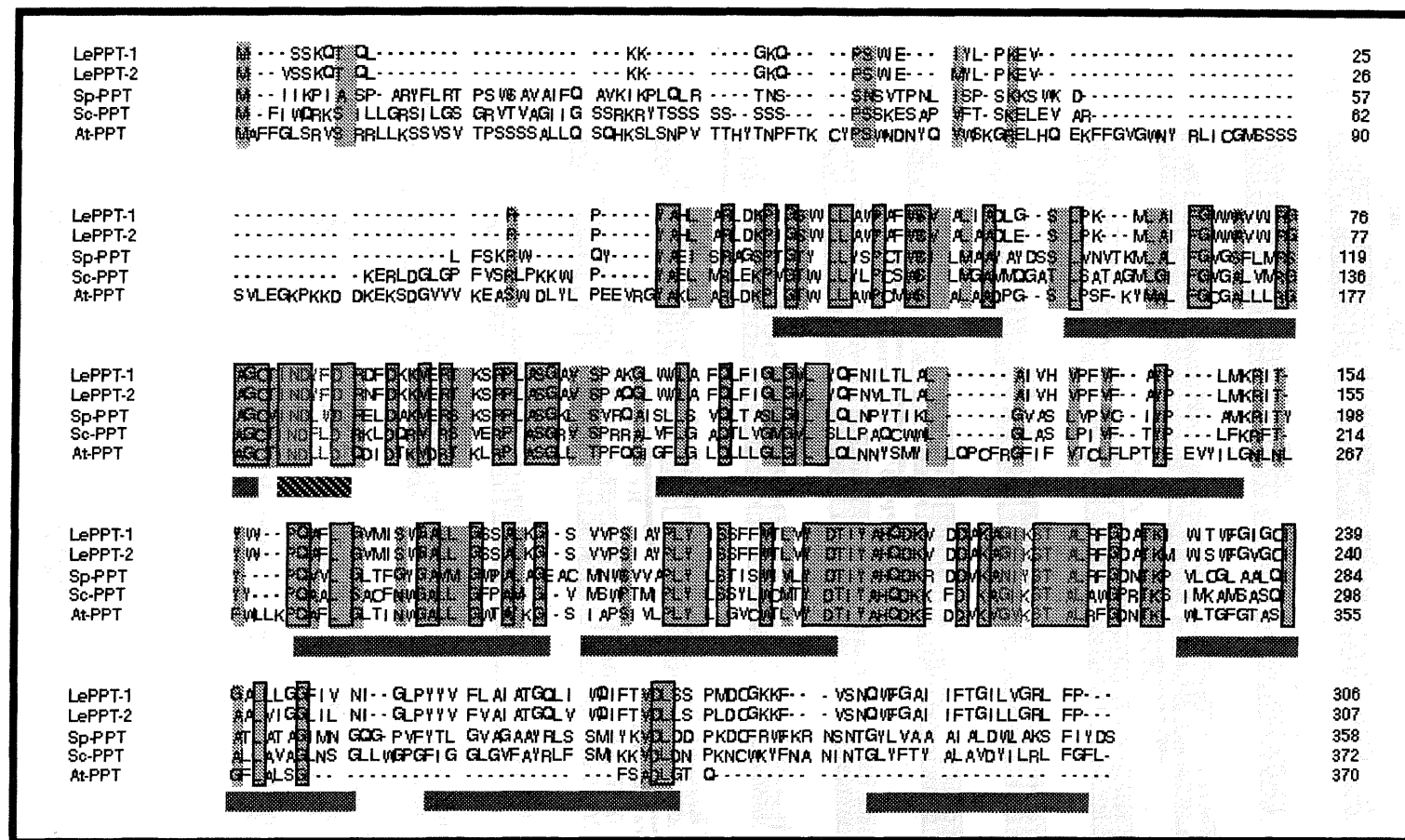
LePPT-1、2 は互いに DNA レベルで 74% (Fig. 2-5)、アミノ酸レベルで 93%の相同性を有しており、LePPT-1 は 306 アミノ酸、LePPT-2 は 307 アミノ酸をコードしていた。これらの UTR には相同性は無く、5'UTR は LePPT-2 の方が約 90 塩基ほど長くなっていた。また hydropathy plot によると、本蛋白質は非常に疎水性が高く 8~9 回膜貫通型の膜蛋白質であることが示唆された (Fig. 2-6、下線)。

アミノ酸レベルで他の真核生物の PPT と比較すると (Fig. 2-6)、活性部位と思われる 2 箇所の親水性領域の配列が高く保存されていた。N 末端に近い方がプレニル基認識部位と推定される INDXXD 配列³¹⁾であり、他方が COQ2 ファミリーに良く保存されている GIKSTAL 配列であ

る。後者は PHB 認識部位と推定されているが、実験的根拠は今のところ示されていない。また、CBS サーバーの signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/signalP/>) を用いて輸送シグナルの解析を行ったところ、LePPT 以外の PPT (PPT-like protein) は全てミトコンドリア移行シグナルを有しており、COQ2 と同様ミトコンドリアでのユビキノン生合成に関わるものであると考えられた。実際、出芽酵母と分裂酵母では、これらの蛋白質がミトコンドリア局在であるというデータがある。一方で LePPT はミトコンドリア輸送シグナルを持っておらず、このことから、本蛋白質がユビキノン生合成に参与する他の PPT とは異なり ER に輸送される可能性が示唆され、これはシコニン生合成における GT が ER 膜に局在するというデータとよく一致していた。

LePPT-1	-----	75
LePPT-2	TCATCACATC TCTCAGTTTT CTCTGCTTCT TTAAATACTT CAAACTAAAT TTGTTAATAC TACTTCTAC AAGTG	
LePPT-1	-----	68
LePPT-2	ATATTTTGG- ATTTTTCCTA AG-ATTTTCCA CAAATA-TA TAAATGAA- TTTTCTC- AAGAATGT TTTCA	142
開始コドン		
LePPT-1	CEAAACAAAC ACAGCTDAAG AAAGGCAAGC AACCATGTG GATTGAGATG TATTTCCTA AAGAAGTTCG CCTT	143
LePPT-2	CAAAACAAAC ACAGCTDAAG AAAGGCAAGC AACCATGTG GATTGAGATG TATTTCCTA AAGAAGTTCG CCTT	216
LePPT-1	ATGCTCATCT AGCAAGGTA GACAAGCCTA TAGGAGTTG GCTTCTAGCT TGGCGGCGT TTTGGTCCGT TGCAT	218
LePPT-2	ATGCTCATCT AGCAAGGTA GACAAGCCTA TAGGAGTTG GCTTCTAGCT TGGCGGCGT TTTGGTCCGT TGCAT	291
LePPT-1	TGGTCTGA TCTTAAAGT CTCTTAAAA TTTTGGCAAT ATTTGGATGG TGGGCAGTTT GGAATAGAGG TGCTG	293
LePPT-2	TGGTCTGA TCTTGAAGT CTCTTAAAA TTTTGGCAAT ATTTGGATGG TGGGCAGTTT GGAATAGAGG TGCTG	366
LePPT-2 5'RACE primer		
LePPT-1	GATGACCAT TAACGATTAC TTEGACCGGA ATTTGATAA CAAGGTTGAA CGTACAAAAT CTAGACCTCT TGCAT	368
LePPT-2	GATGACCAT TAACGATTAC TTEGACCGGG ATTTGATAA CAAGGTTGAA CGTACAAAAT CTAGACCTCT TGCAT	441
LePPT-1	GTGCTGAGT CTGACGAGCA AAGGCCTGT GGTGGCTTGC ATTTCAACTG TTTATTGCT TGGTGTCT TTAGC	443
LePPT-2	GTGCTGAGT CTGACGAGCA AAGGCCTGT GGTGGCTTGC ATTTCAACTG TTTATTGCT TGGTGTCT TTAGC	516
LePPT-1	AATTCAT CTGACCTT GCATTGCTA AGTCATGT CCGTTTGGT TTTGCTTA CTCTCATGAA AAGAA	518
LePPT-2	AATTCAT CTGACCTT GCATTGCTA AGTCATGT CCGTTTGGT TTTGCTTA CTCTCATGAA AAGAA	591
LePPT 3' RACE primer		
LePPT-1	TTAGCTATTG GCCTCAAGG TTTCTTGGAG TATGATAG TTGGGGAGCT CTCTAGGCT CCTCTGCT TAAAG	593
LePPT-2	TTAGCTATTG GCCTCAAGG TTTCTTGGAG TATGATAG TTGGGGAGCT CTCTAGGCT CCTCTGCT TAAAG	666
LePPT-1	GAAGCTTGT TCCAAGCAT GCCTACCGC TACATTTC TAGCTTTTC TGGACTCTTG TTTATGATAC TATC	668
LePPT-2	GAAGCTTGT TCCAAGCAT GCCTACCGC TACATTTC TAGCTTTTC TGGACTCTTG TTTATGATAC TATC	741
LePPT-1	ATGCACATCA AGATAAGGTC GACGACGGA AAGCTGAT TAAATGAGA GCTTACAT TTGGAGATGC TACCA	743
LePPT-2	ATGCACATCA AGATAAGGTC GACGACGGA AAGCTGAT TAAATGAGA GCTTACAT TTGGAGATGC TACCA	816
Rv-2 degenerate primer		
LePPT-1	AAATCTGGAT TAGTTGGT TGGACTAGGAT GCATTCTGC TCTACGAT GCGGGTCA TTCAACAT TGGG	818
LePPT-2	AAATCTGGAT TAGTTGGT TGGACTAGGAT GCATTCTGC TCTACGAT GCGGGTCA TTCAACAT TGGG	891
LePPT-1	TGCCTTATTA TGTCTT TG GCAATTGCAA CTGGTCAATT GCTTGGCAG ATTTTCACG TTGATCTAT ATCTC	893
LePPT-2	TGCCTTATTA TGTCTT TG GCAATTGCAA CTGGTCAATT GCTTGGCAG ATTTTCACG TTGATCTAT ATCTC	966
LePPT-1	TGGGATTC TGGCAAGG TGTCTGCA ACAAATGGT TGGTCTTA ATCTTCACCG TATCTTCT TGGCA	968
LePPT-2	TGGGATTC TGGCAAGG TGTCTGCA ACAAATGGT TGGTCTTA ATCTTCACCG TATCTTCT TGGCA	1041
LePPT-1	GATTGTTCG TTAGAAAATG AATTCATCT AATTGTGATT CTAGATT GTATTGATAC CTCAATCC TTAG	1043
LePPT-2	GATTGTTCG TTAGAAAATG AATTCATCT AATTGTGATT CTAGATT GTATTGATAC CTCAATCC TTAG	1099
終止コドン		
LePPT-1	GTCTGTAAT TGTATCTTA TGTATGAG GTGTCTGCA GAATTCAT C-----	1094
LePPT-2	GTCTGTAAT TGTATCTTA TGTATGAG GTGTCTGCA GAATTCAT C-----	1171
LePPT-1	-----	1094
LePPT-2	TTGGTAGTAA AT	1183

Fig. 2-5 LePPT-1、LePPT-2の全長 cDNA配列



Sp: *Schizosaccharomyces pombe*
 Le: *Lithospermum erythrorhizon*
 At: *Arabidopsis thaliana*
 Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

■ 予想膜貫通領域
 赤色文字 PHB: PPTの保存アミノ酸配列
 ■■■■■ プレニル基認識領域

Fig. 2-6 LePPTと真核生物PPTとのアミノ酸アラインメント

ムラサキにおける LePPT の発現解析

前章までで、単離した LePPT-1、2 がシコニン生合成の GT かどうかは不明であった。そこで、これら 2 クローンのムラサキにおける発現解析を行うことで、本クローンがシコニン生合成酵素の GT であるのか、またはユビキノン生合成酵素等の別の PPT であるのかを推定することにした。

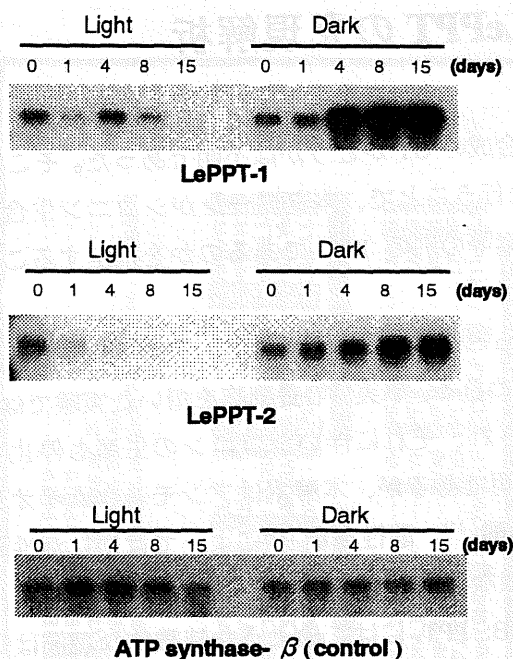
ムラサキにおけるシコニンの生合成は根部に限られているが、これは生合成酵素の活性、少なくとも GT が光によって強く抑制されるためと思われる。事実、培養細胞を用いた実験では、GT は光照射によってほぼ完全にその活性を抑制され、それに伴いシコニンの生産も停止することがわかっている¹⁰⁾。またその生理的意義は不明であるが、本酵素はアンモニウムイオン、2,4-D によっても活性が強く抑えられ、ジャスモン酸¹¹⁾、酸性多糖¹³⁾によっては逆に活性が上昇することが知られている。GT がこのように多様な活性調節を受けている一方、生命維持の基本的機能を担うユビキノン生合成酵素である PHB: PPT にはこのような特徴的な調節は知られておらず、恒常的発現をしているものと考えられる。

またゲノムサザンを行い、本クローンがムラサキに何コピー存在するのか確認を試みた。

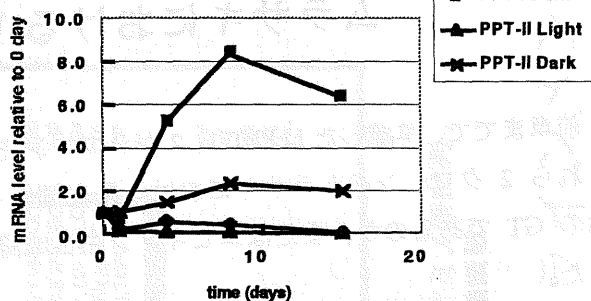
3-1 光による発現抑制

シコニン生合成に関与する GT の、発現様式における最大の特徴は光による発現抑制である。そこで光による LePPT 発現への、mRNA レベルでの影響を調べることにした。ムラサキ培養細胞 (M-18 株) 1g を M9 培地に移植して、光照射下 ($80 \mu\text{E}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$) と暗黒下でそれぞれ振とう培養し、経時的 (移植時、培養 1 日目、4 日目、8 日目、15 日目) に細胞をサンプリングした。これらの細胞から mRNA を抽出して (2-1 と同様の kit を使用) ナイロンメンブレンにブロッティングし、LePPT-1、LePPT-2 の 5'末端側各約 0.7kbp をプローブに Northern hybridization を行った (これらのプローブによる cross-hybridization は、核酸量が 10ng 以下ならば LePPT-1 と -2 をほぼ特異的に検出できることを確認した)。RI の検出は X 線フィルム (Kodak) への感光により、シグナルの定量はバイオイメージングアナライザー-BAS-2000 (富士フィルム) により行った。発現量を数値化するため control として、タバコの ATP synthase β -subunit をプローブに用いた hybridization で補正を行い、0 日目の発現量を 1 として mRNA をグラフにプロットした。一方、培養細胞のサンプリングと平行して、同条件下での培地へのシコニン蓄積量も、経時的にサンプリングすることで測定した (Fig. 3-1)。

Northern hybridization



mRNA相対量 (0day=1)



シコニン蓄積量

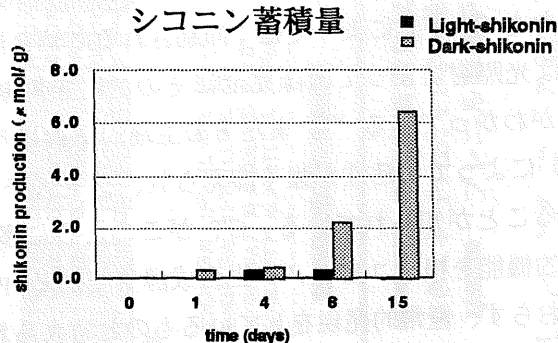


Fig. 3-1 暗黒下及び光照射下における **LePPT** の mRNA 発現量とシコニン蓄積量

その結果、LePPT-1、-2 共に光によって mRNA の発現が制御されていることが明らかとなった。すなわち光照射によって発現は強く抑制されており、逆に暗黒下では、移植後 1 週間目～2 週間目のシコニン蓄積量の急激な増加に先んじて、LePPT の発現誘導は約 1 週間で最大となり、その後も高いレベルで保持されていた。これは、LePPT がシコニン生合成と関連していることを示唆する結果であった。

3-2 2,4-D 及びアンモニウムイオンによる発現抑制

物理的制御因子である光に引き続き、化学的制御因子の LePPT 遺伝子発現に対する影響もあわせて観察した。2,4-D 及び NH_4^+ の影響を見るため、M9 培地に終濃度 $1\mu\text{M}$ の 2,4-D または 1mM の NH_4^+ を添加し、その時の LePPT mRNA レベルを無添加の M9 培地でのそれと比較することにした。ムラサキの培養細胞は移植して暗黒下で培養後、7 日目にサンプリングした。ここから total RNA を抽出し、3-1 と同様に LePPT-1、2 をプローブに Northern 解析を行った (Fig. 3-2)。数値の補正 control には 18S rRNA を用い、3-1 と同様に 0 日目の発現量を 1 としている。

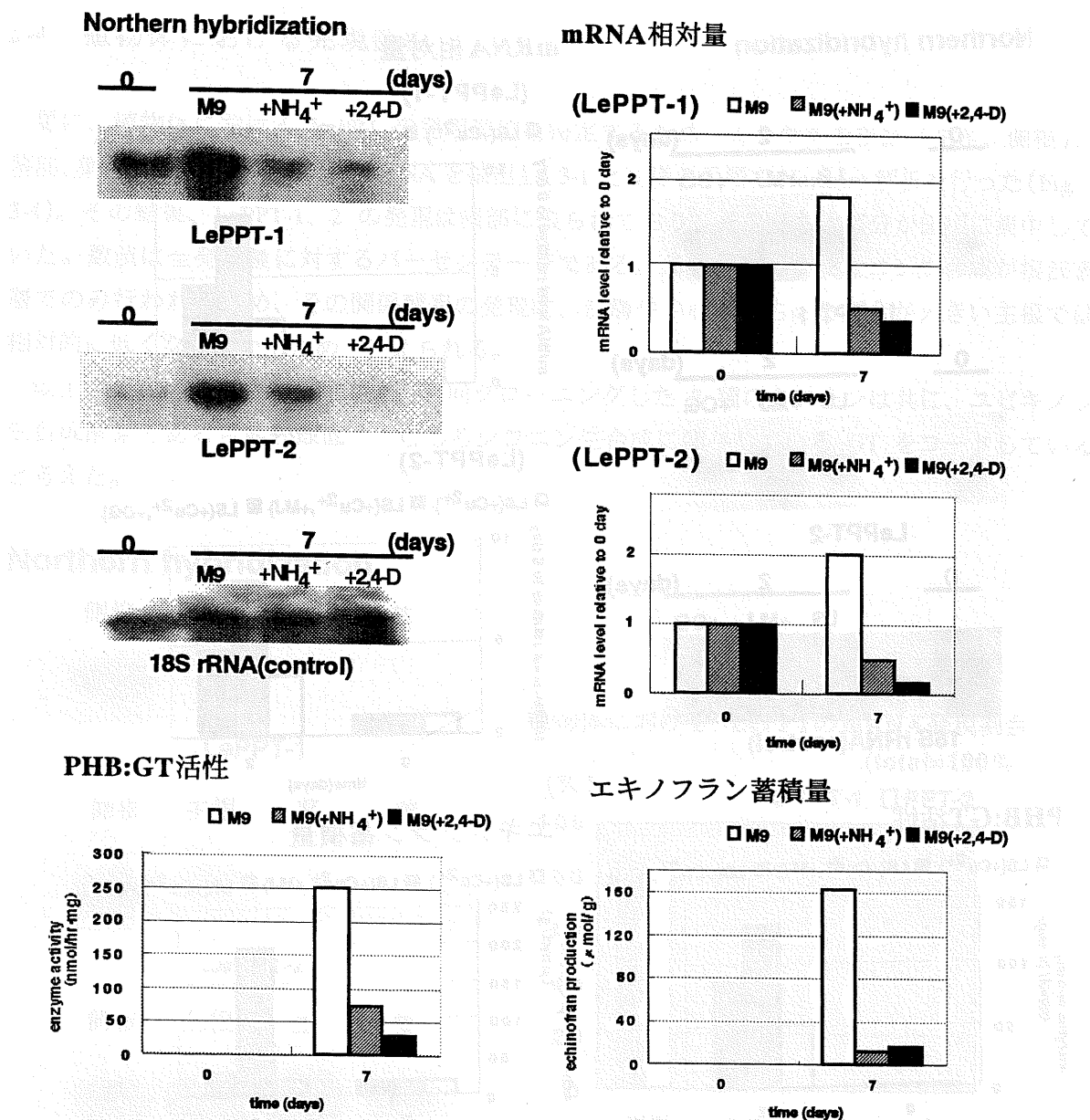


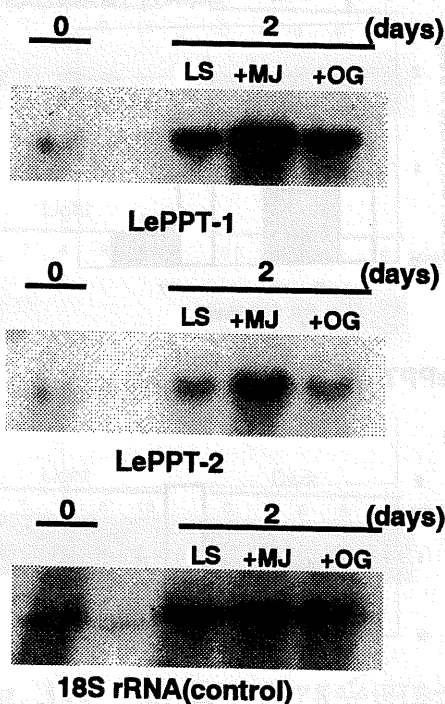
Fig. 3-2 LePPTのmRNA発現、GT活性、エキノフラン蓄積量に対するアンモニウムイオンと 2,4-Dの影響

サンプリングと平行して培養細胞における GT の酵素活性測定を行い、mRNA の発現パターンと比較した。また同時に、培地中のジヒドロエキノフラン (DHEF) 及びエキノフラン B (EFB) 蓄積量も測定した。DHEF 等は、GT によるカップリング反応後、シコニンよりも迅速に生合成される副産物であることから (Fig. 1-3)、GT 活性変動の代謝産物への反映を短期間でモニターするにはより適した化合物である^{13) 32)}。

その結果、LePPT-1、2 の mRNA の発現は共に、2,4-D、NH₄⁺によって強く抑制されること、またその発現の変動は、GT 活性及びエキノフラン類の蓄積量と良い一致を示すことが明らかとなった。

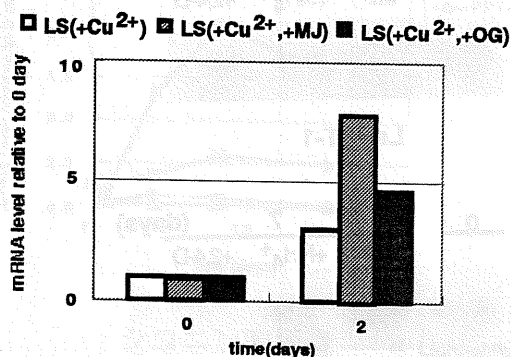
3-3 ジャスモン酸及び酸性多糖による発現誘導

Northern hybridization

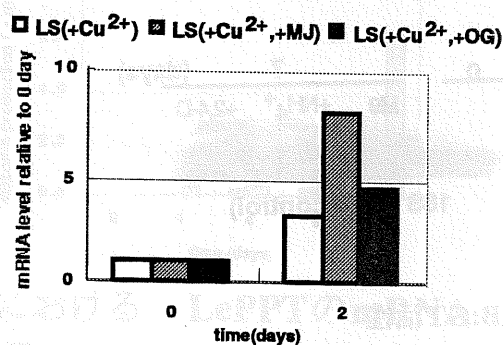


mRNA相対量

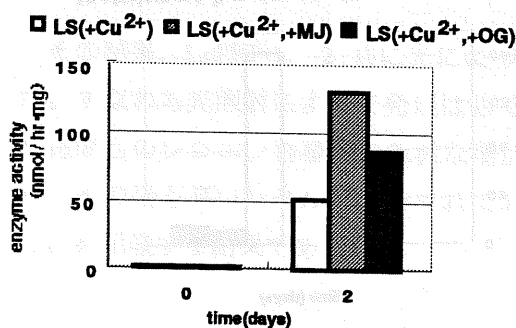
(LePPT-1)



(LePPT-2)



PHB:GT活性



エキノフラン蓄積量

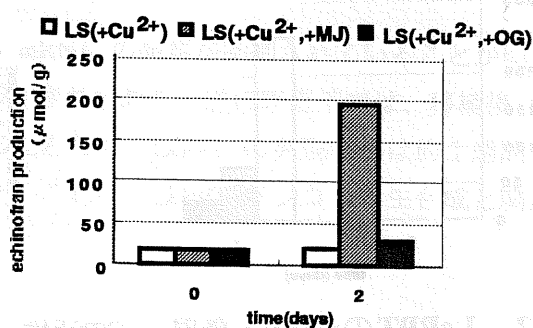


Fig. 3-3 LePPTのmRNA発現、GT活性、エキノフラン蓄積量に対するメチルジャスモン酸 (MJ) 及び酸性多糖 (OG) の影響

次に、ジャスモン酸、酸性多糖の添加により LePPT の発現に誘導がかかるか否かを観察した。これらの因子による GT 誘導には高濃度の銅イオンが必須であるため、あらかじめ終濃度 $1.2\mu\text{M}$ となるよう Cu^{2+} を加えた LS 培地 (通常の LS 培地の Cu^{2+} 濃度は $0.1\mu\text{M}$) を用い、これに終濃度 $10\mu\text{M}$ のメチルジャスモン酸 (MJ)、または $100\mu\text{g/ml}$ のオリゴガラクトツロン酸 (OG) を加え、培養細胞を移植した。暗黒下培養 2 日目にサンプリングし、

3-2 と同様に Northern 解析、GT 酵素活性測定、DHEF 蓄積量の測定を行った (Fig. 3-3)。

その結果、OG の影響はわずかではあるが、MJ によっては明らかに LePPT-1、2 ともに mRNA 発現が誘導され、これは GT 活性及びエキノフラン類の蓄積量に対する影響と同調していた。

3-4 植物体における発現部位

更に、植物体における LePPT の発現部位を特定するため、ムラサキを根部（主根、側根）、茎部、葉部に分割してそれぞれ mRNA を抽出し、3-1 と同様の手順で Northern 解析を行った (Fig. 3-4)。その結果、LePPT-1、2 の発現は根部に限られており、そのうち大部分が側根に集中していた。数値は全発現量に対するパーセンテージである。この偏りは、シコニン生合成が根部表層でのみ行われるため、その関係酵素の発現は、皮層や中心柱の占める割合が大きい主根では相対的に低くなっているためと考えられる。

以上の発現解析結果を総合して、今回クローニングした 2 種のクローンは共に、ユビキノン生合成酵素である可能性は低く、むしろシコニン生合成に関与している GT をコードしていると考えた。

Northern hybridization

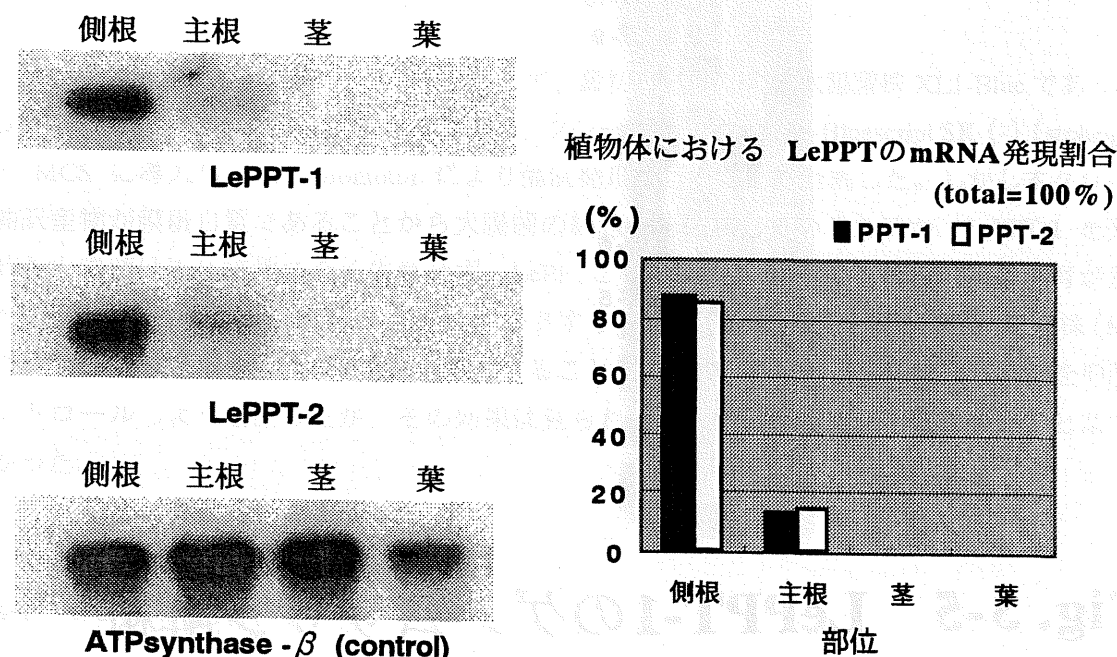


Fig. 3-4 LePPTの植物体における発現部位

3-5 ゲノムサザン法による LePPT ファミリーの探索

ムラサキのゲノムの中には、シコニン生合成に携わる酵素プレニルトランスフェラーゼとともに、普遍的に存在するユビキノン生合成酵素 (*COQ2* のムラサキのホモログ) が存在することが予想される。そこで LePPT をプローブとして、ムラサキに存在する PHB: PPT の遺伝子ファミリーの形成を検定することを試みた。ムラサキ植物体は天藤製薬株式会社にて保存されている系統（長野県産）及び仙台産の 2 種、制限酵素には *EcoR* I、*Hind* III、*EcoR* V (NEB) の 3 種を用いた。680 bp の LePPT-1 断片をプローブに low-stringent の条件で Southern hybridization を行ったところ、強いバンドが 2~3、弱いバンドが 2 本認められ、本クローンのホモログは相

同性の高いものが 2~3 コピー、低いものが 2 コピー存在すると推定された (Fig. 3-5)。相同遺伝子のうち 1 つは LePPT-2 であると予想され、LePPT の遺伝子ファミリーは小さいものであることが判明した。すなわちムラサキには、LePPT-1、2 によってコードされるシコニン生合成関連のプレニルトランスフェラーゼ以外には、ユビキノン生合成系の酵素が存在するにすぎない可能性も考えられた。

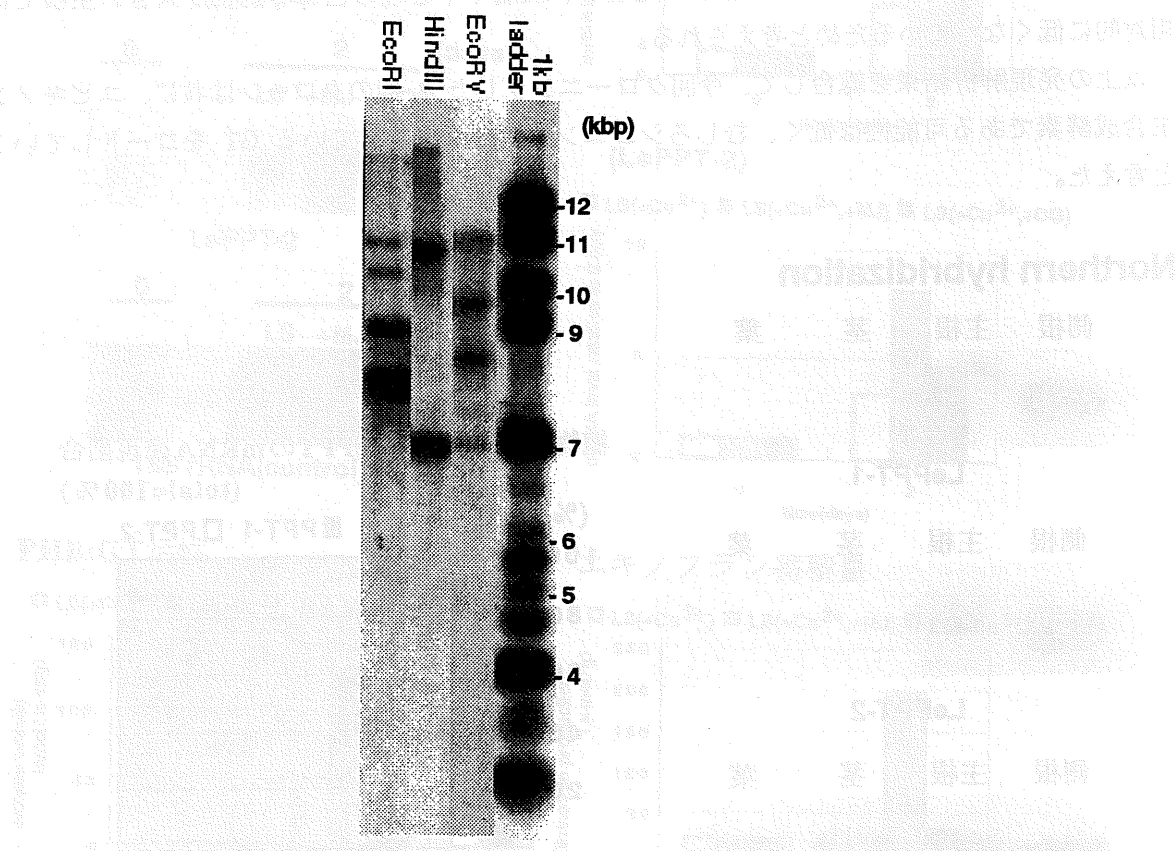


Fig. 3-5 LePPT-1のゲノムサザン解析

酵母における LePPT の強制発現および機能解析

前章までに、ムラサキにおける Northern 解析の結果、化学因子による発現調節パターンが GT 活性のそれと類似していること、及びその発現部位が根部に限られていることより、LePPT-1、-2 はともにシコニン生合成に関与しているであろうことを推定した。またそのアミノ酸配列より、本クローンは膜局在性の、PHB を基質とするプレニルトランスフェラーゼであると予測した。

そこで本クローンをヘテロなホストにおいて強制発現させ、実際にその酵素としての機能の証明を行うことにした。すなわち、まずシコニン生合成酵素として、PHB にゲラニル基を転移する酵素活性を保有しているか否か、次にその活性がゲラニル基に特異的なものであるかどうかを検定し、本クローンがシコニン生合成のための GT であり、ユビキノン合成酵素とは異なる性質を持つことを示すことにした。

LePPT の強制発現実験を行うホストとして、最初に試みたのは大腸菌株 XL1-Blue であった。LePPT-1、-2 の CDS region 全体をそれぞれ、フレームを合わせて p-Bluescript SK (-) (stratagene) の MCS に導入し、lacZ promotor により強制発現を行うことを計画した。しかし本クローンの翻訳産物が膜蛋白質であることから大腸菌の細胞膜を破壊しているためか、LePPT-1 を発現させた大腸菌は液体培地で全く生育せず、LePPT-2 を発現させたものも極端にその生育が悪かった。そこで lacZ promotor の repressor をコードする pREP4 (QIAGEN) を前もって大腸菌株 (M15) に導入し、その後重ねて LePPT を導入することによって LePPT 蛋白質の大量発現を抑制、コントロールしようと試みたが、その効果は見られず、大腸菌を十分に生育させることはできなかった。

4-1 COQ2 欠損株の作成

大腸菌をホストとした LePPT 発現は不可能と判断したため、一般に膜蛋白質発現実験に用いられる出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) をホストとして、本クローンの強制発現を行うことにした。

しかし前述の通り、酵母はユビキノン生合成系 PPT 遺伝子である COQ2 を保有している。この酵素の役割はミトコンドリアにおいて PHB とヘキサプレニル基 (C30) のカップリングを行うことであるが (Fig. 2-1)、その酵素学的解析より、本酵素はかなり基質特異性が広く²⁹⁾、ヘキサプレニル基のみならず、ゲラニル基 (C10) をも基質として認識することが分かっている。つまり、酵母において外来蛋白質の GT 活性を測定する際に、ホスト自身の保有する COQ2 により GT 活性のバックグラウンドが上昇してしまうことが考えられた。そこで酵母の COQ2 遺伝子を破壊し、これをホストとすることにした。

野生酵母株としては W303-1A [*ade2-1/ his2-11,15/ leu2-3,112/ trp1-1/ ura3-1*] を用い、下図の方法にしたがって³³⁾、相同組換えによって COQ2 の大部分を Genetisin 耐性 (マーカー) 遺伝子

と置換した *COQ2* 欠損株を作成した (Fig. 4-1)。

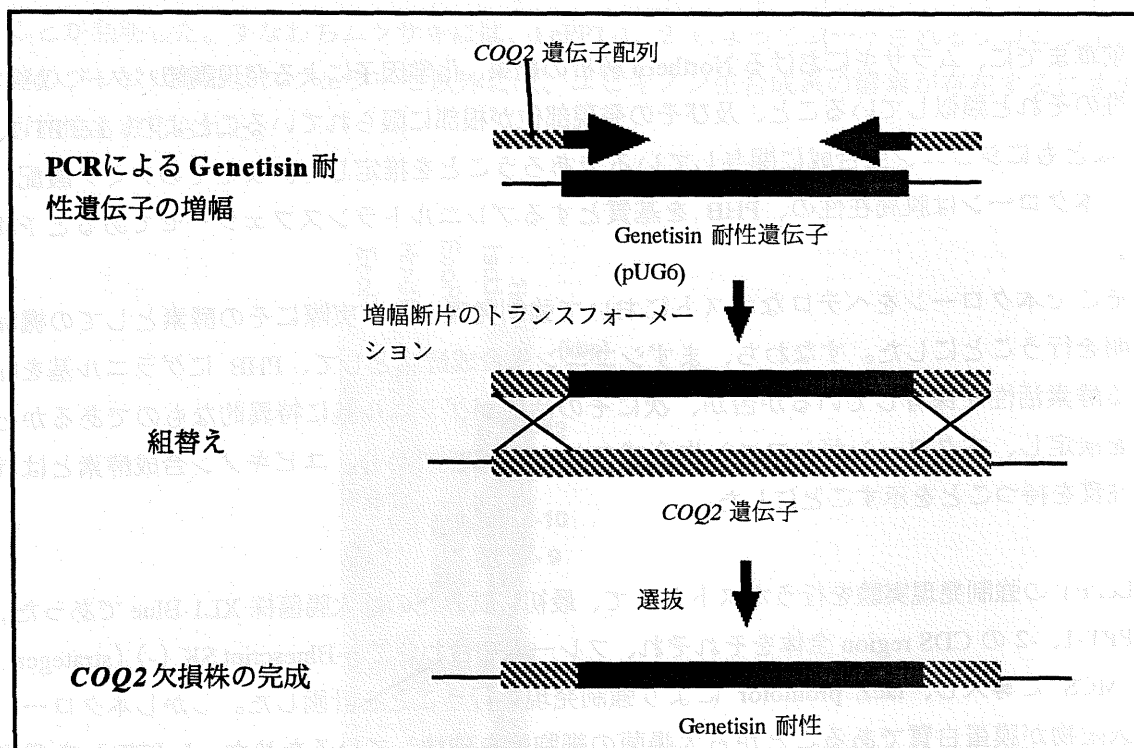


Fig. 4-1 酵母 *COQ2* 遺伝子の破壊

COQ2 遺伝子が破壊されていることの確認は、PCR を用いたゲノムレベル、および *COQ2* 欠損株の形質レベルで確認した。PCR は、野生株酵母および *COQ2* 欠損株酵母からそれぞれゲノムを抽出し、*COQ2* 遺伝子の両端の配列をプライマーに用いて行った。野生株では *COQ2* の全長約 1.5kbp 断片が増幅し、*COQ2* 欠損株では Genetisin 抵抗性遺伝子を含む約 2kbp 断片が増幅した (Fig. 4-2)。また *COQ2* 欠損株は炭素源の発酵経路がうまく機能せず、グリセロールを炭素源として利用できないことが知られている³⁴⁾。すなわち、SD 最小培地 (2% グルコース) においては生育できるものの、SD (3% グリセロール) では生育できない。この形質を利用して *COQ2* 遺伝子欠損の判定を行った結果、得られた Genetisin 耐性株 16 株のうち、15 株の *COQ2* 遺伝子が破壊されていることが分かった。また、この欠損株の形質は *COQ2* 遺伝子を再導入することで回復していた (Fig. 4-3)。そこで、LePPT-1、-2 がこの形質を回復させる能力があるかどうかを調べるため 2 種の LePPT の形質転換酵母をそれぞれグリセロール培地にて培養したが、complementation は認められなかった (data not shown)。これにはいくつかの理由が考えられ、第一に、LePPT がヘキサプレニル基を基質とできないこと (後述)、第二に、LePPT がミトコンドリアに輸送されていない可能性が高いことが考えられた。いずれにせよ LePPT は、そのままでは *COQ2* の機能を相補できないことを確認した。

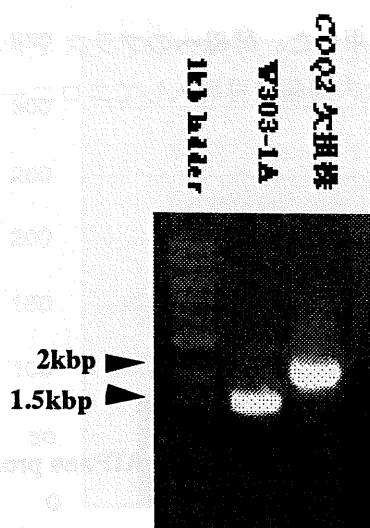


Fig. 4-2 PCRによる *COQ2* 欠損株の確認

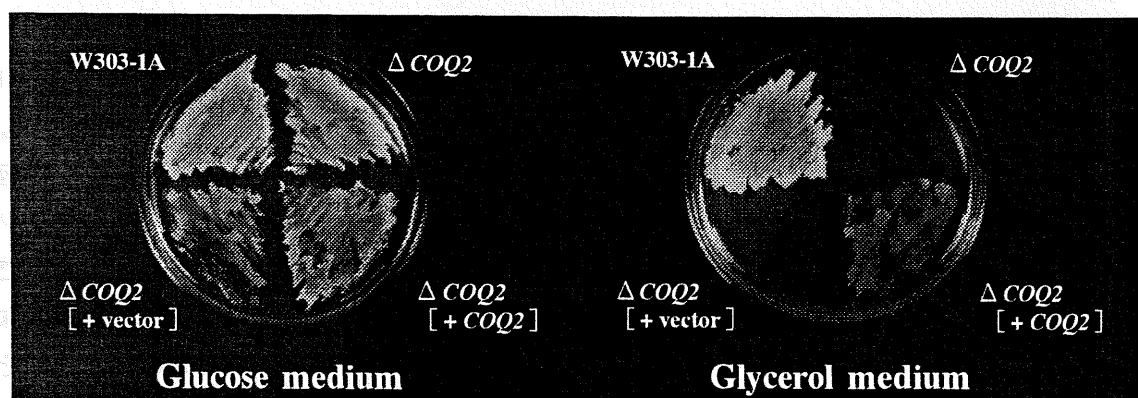


Fig. 4-3 酵母 *COQ2* 破壊株の形質とその回復

4-2 LePPT のゲラニルトランスフェラーゼ活性

酵母 *COQ2* 欠損株への遺伝子の形質転換ベクターには、Tübingen 大学の Frommer 博士より分与いただいた pDR196 (pDR195³⁵ の MCS を改変したもの) を用いた。このベクターに組み込まれた遺伝子は、酵母の中で Plasma membrane ATPase (PMA) -1 promotor により恒常的に強く発現する (Fig. 4-4)。このベクターに 2 種の LePPT の CDS を *EcoR* I (5')、*Xho* I (3') サイトで接続した p-LePPT-1、p-LePPT-2 を作成し、ベクターコントロールとしての pDR196 とともに *COQ2* 欠損株への形質転換を行った。pDR196 にはマーカーとして Uracil 要求性の相補遺伝子

があるため、選択培地には SD (-Uracil) 培地を用いた。酵母へのプラスミド導入の確認は、形質転換した酵母からプラスミドを抽出し、それを大腸菌に再導入してコロニー PCR することにより行った。

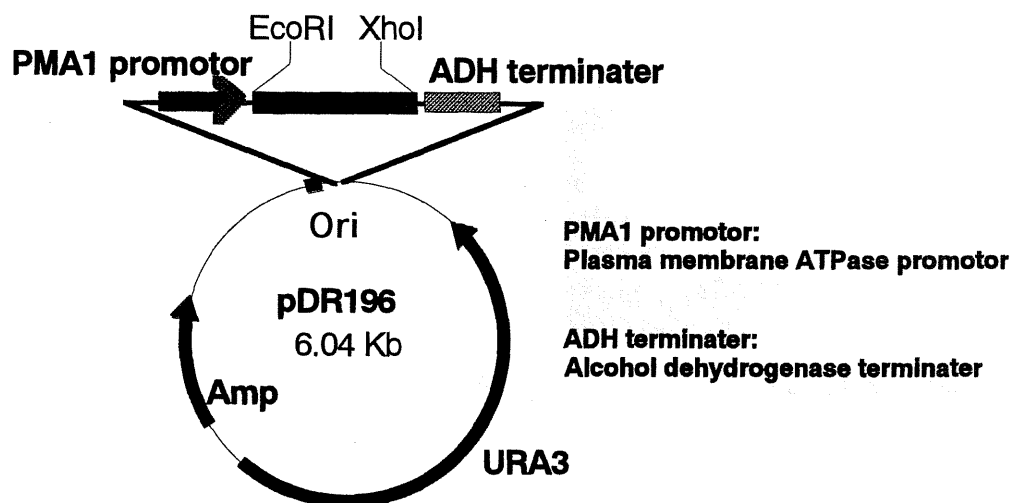


Fig. 4-4 酵母形質転換ベクター pDR196の構造

野生株酵母は YPAD 培地、形質転換した 3 種類の酵母は Genetisin (200 μ g/ml) を加えた YPAD 培地で 30°C で振とう培養 (16 hr. ~ 30 hr.) し、酵素活性を測定するために対数増殖期 ($OD_{600} = 1.5 \sim 2.0$) で回収した。スフェロプラスト法により細胞壁を消化、ダウンス型破砕器で細胞破砕し、10,000g 遠心分離によりミトコンドリア画分を、100,000g 超遠心分離によりミクロソーム画分を回収し、粗酵素液として用いた。この粗酵素液を用いて GT 活性の測定を HPLC で行った結果、野生株のミトコンドリア画分で見られる COQ2 による GT 活性は、COQ2 欠損株では完全に無くなっていることを確認した。これに LePPT-1 または-2 を導入した酵母では、そのミクロソーム画分で、ベクターコントロールには見られない明らかな GT 活性が観察された (Fig. 4-5)。このことより LePPT の遺伝子産物は共に、少なくとも酵母において、ミクロソーム上で GT 活性を示す酵素であることが確認できた。更に、熱変成させた粗酵素液を用いて同様の活性測定を行い、HPLC で反応産物 GBA (geranyl-p-hydroxybenzoic acid) が全く検出されないことを確認した。

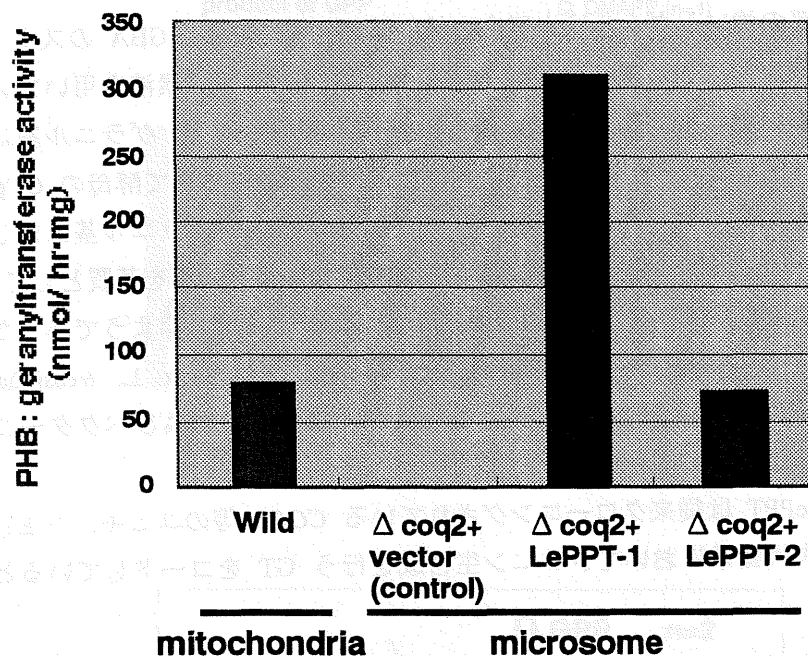


Fig. 4-5 酵母における強制発現 LePPTのGT活性

LePPT の強制発現による遺伝子産物の蓄積を観察するために、抽出したミクロソーム画分の粗酵素液を用いて SDS-PAGE を行ってみたが、残念ながら予想できるサイズ (34kDa) 付近にベクターコントロールと明らかな差があるバンドは見られなかった (data not shown)。LePPT は、活性は高いものの発現量は SDS-PAGE や CBB 染色で確認できるほどの高いレベルではないと判断された。

4-3 LePPT の酵素基質特異性

LePPT 遺伝子産物が GT 活性を有していることが確認されたことにより、さらにこの基質特異性を検定し、COQ2 遺伝子産物のように広い基質認識性を持つものであるのか、それともゲラニル基にのみ高い基質特異性を示すシコニン生合成系の酵素であるのかを明らかにすることを試みた。

前述の 4-2 項における方法で粗酵素液を抽出し、酵素反応を行った。プレニル基質としてはジメチルアリルニリン酸 (DMAPP/C5)、ゲラニルニリン酸 (GPP/C10)、ファルネシルニリン酸 (FPP/C15)、ゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP/C20) の 4 種を、プレニルアクセプターにはベンゼン環を ^{14}C 標識した放射性 PHB (Sigma) を用いた。FPP との反応産物 farnesyl hydroxybenzoate (FBA) や GGPP との反応産物 geranylgeranyl hydroxybenzoate (GGBA) の検出は、反応産物を TLC で展開した後、その TLC 上の放射活性を BAS2000 を用いて測定することで行った。

TLC においては、Rf 値は PHB に転移したプレニル鎖長に比例しているとされ、実際に検出した酵素反応物のスポットは、C10、C15、C20 と鎖長が長くなるに従って段階的に高くなって

いる。スポットの下部の強いシグナルは未反応の放射性 PHB である。GBA のスポットは標品との直接比較により同定した。4 種の基質に対する反応には同じ粗酵素液を用いているため、反応あたりの酵素蛋白質量は一定になっている。これらの酵素活性を、ゲラニル基に対する活性を 100% として数値化した結果、野生株のミトコンドリア画分において酵母の COQ2 遺伝子産物はゲラニル基のみならずファルネシル基、そして特にゲラニルゲラニル基に対して強い基質認識性を示したのに対し、ムラサキの LePPT は双方ともゲラニル基のみを基質としていた (Fig. 4-6)。ジメチルアリル基に関しては COQ2 産物もあまり活性を有しないようであったが、これと同じ現象は *E. coli* の octaprenyltransferase においても知られている (Dr. L. Wessjohan より)。また、このような反応産物のシグナルは、熱変成させた粗酵素液、およびベクターコントロールによる実験では全く見られないことを確認した。

以上のことから、LePPT は従来クローニングされている COQ2 等のユビキノン生合成酵素とは性質を異にし、二次代謝系においてシコニン生合成を行う GT をコードしていると結論付けられた。

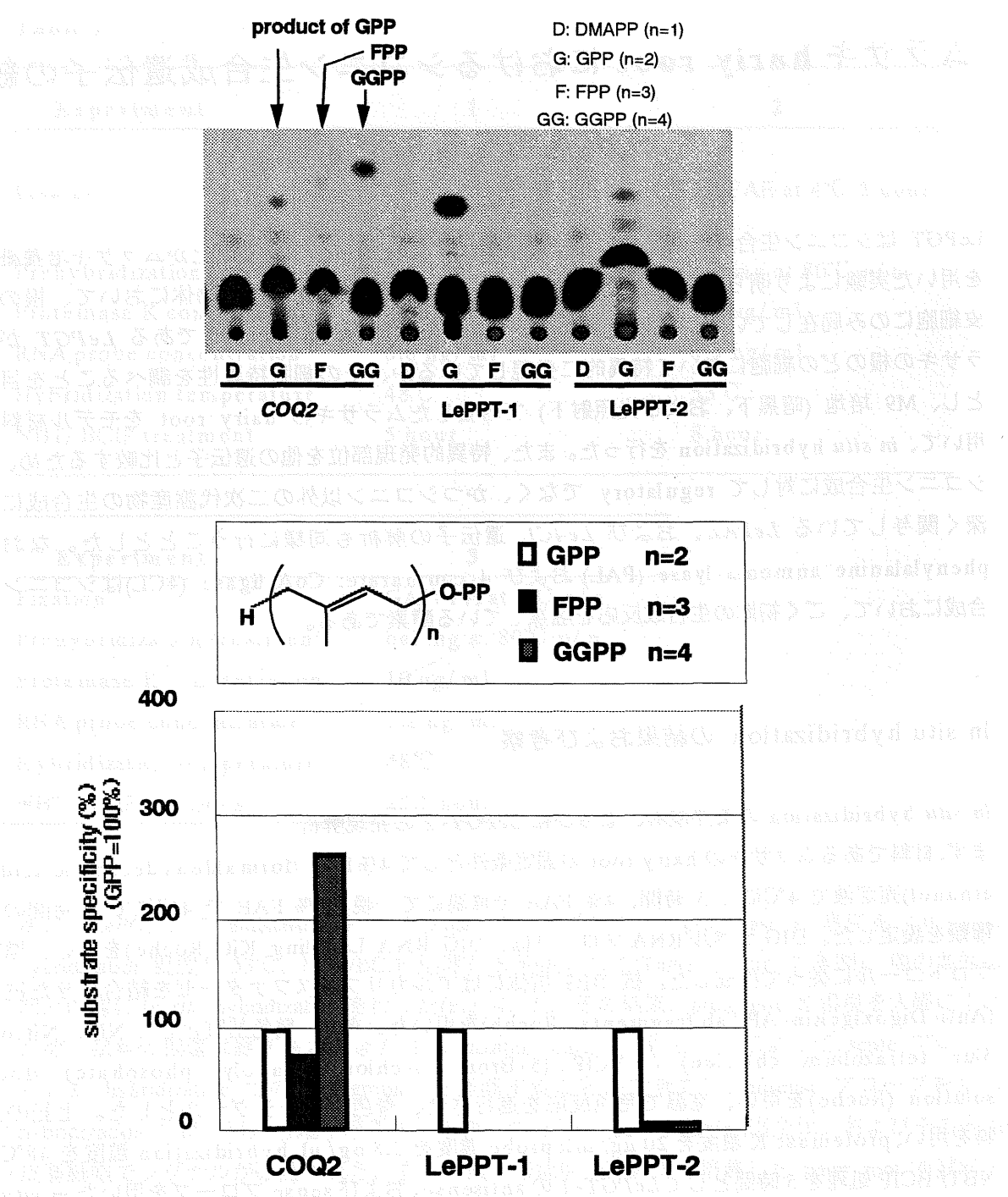


Fig. 4-6 LePPTのプレニル基質に対する基質特異性

左：反応産物を展開したTLCプレート、BAS2000で放射活性検出したもの。

右：測定した放射活性を数値化し、GPPに対する活性を100%としてグラフ化したもの。

ムラサキ hairy root におけるシコニン生合成遺伝子の組織特異的発現の解析

LePGT はシコニン生合成における重要な regulatory enzyme であることがムラサキ培養細胞を用いた実験により明らかにされてきた。一方、シコニンはムラサキ植物体において、根の表皮細胞にのみ局在している。この章では、シコニン生合成の鍵酵素遺伝子である *LePGT* がムラサキの根のどの細胞において特異的に発現しているか、その細胞特異性を調べることを目的とし、M9 培地 (暗黒下、および光照射下) で培養したムラサキの hairy root をモデル材料に用いて、*in situ* hybridization を行った。また、特異的発現部位を他の遺伝子と比較するため、シコニン生合成に対して regulatory でなく、かつシコニン以外の二次代謝産物の生合成にも深く関与している *LePAL*、および *Le4CL* 遺伝子の解析も同様に行うこととした。なお、phenylalanine ammonia-lyase (PAL) および 4-coumarate: CoA ligase (4CL) はシコニン生合成において、ごく初期の生合成反応を触媒している酵素である。

In situ hybridization の結果および考察

In situ hybridization の条件検討、ならびに *LePGT-1* の発現解析

まず、材料であるムラサキの hairy root の固定条件として 4% FAE (formaldehyde, acetic acid, ethanol) 固定液で 4°C にて 3 時間、4% FAE で常温にて一晩、2% FAE で 4°C にて 3 時間の 3 種類を設定した。DIG ラベル RNA プロブは、DIG RNA Labeling Kit (Roche) を用い、標準プロトコールに従って作成した。抗 DIG 抗体にはアルカリフォスファターゼを結合させた抗体 (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche) を用いた。また、発色基質として NBT (Nitro blue tetrazolium chloride) / BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) stock solution (Roche) を用い、室温で発色反応を進行させ、青色発色をシグナルとした。上記の試料を用い、proteinase K 濃度を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、probe 濃度を 0.8 $\text{ng}/\mu\text{l}$ 、hybridization 温度を 48°C、NBT/BCIP 処理を 5 時間として *LePGT-1* の antisense、および sense プロブを用いた *in situ* hybridization を行った (Table. 1 Exp. 1 参照)。この最初の実験の結果では、antisense プロブを用いた hybridization において、表皮、および皮層細胞に強い青色のシグナルが確認されたが、同時に sense プロブを用いた場合にもシグナルが確認された。これは sense プロブの非特異的な hybridization による background と考えられたため、次回は hybridization 温度を上げることとした。また、proteinase K 処理が過剰だったためか、特に試料の表皮における損傷が著しく、次回は proteinase K 濃度を下げることにした。なお、試みた 3 種類の固定条件間で、試料の強度や組織の状態に明確な差が見られなかったため、次回の実験での固定条件は 4% FAE で 4°C にて 3 時間処理することとした。

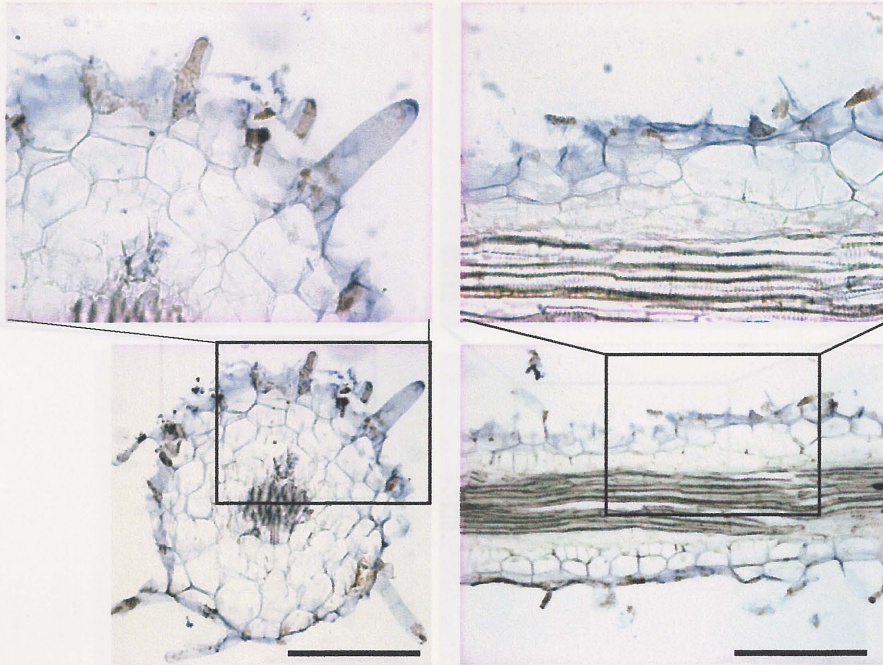
Table I

Experiment	1	2
Fixation	2% FAE at 4°C 3 hour 4% FAE at 4°C 3 hour 4% FAE at RT o/ n	4% FAE at 4°C 3 hour
Prehybridization treatment	-	baking at 80°C o/ n
Proteinase K concentration	20 µg/ ml	1.0 µg/ ml
RNA probe concentration	0.8 ng/ ml	0.8 ng/ ml
Hybridization temperature	48°C	53°C
NBT/ BCIP treatment	5 hour	8 hour

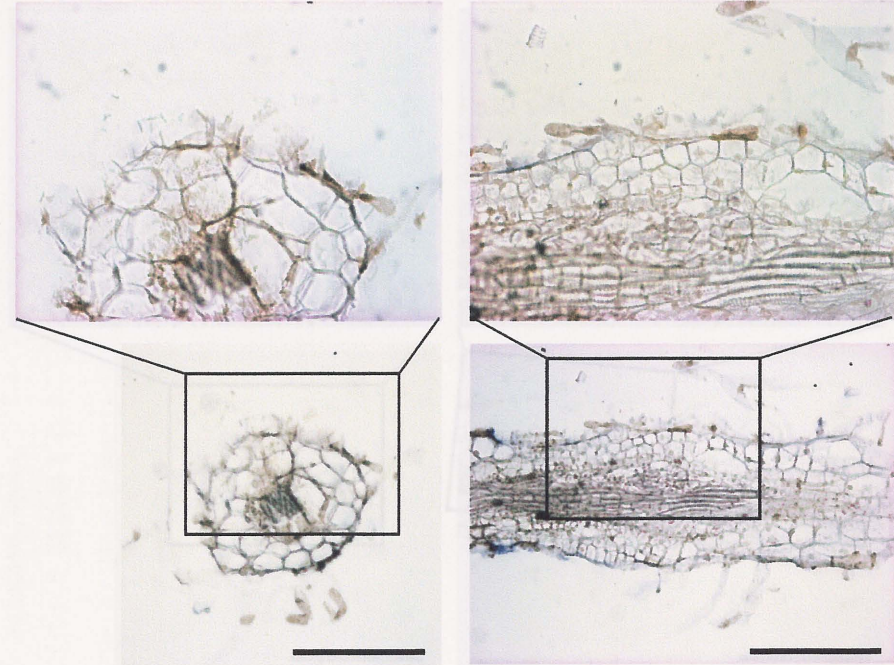
Experiment	3
Fixation	GA/ PFA at 4°C o/ n
Prehybridization treatment	baking at 80°C o/ n
Proteinase K concentration	10 µg/ ml
RNA probe concentration	1.2 ng/ ml
Hybridization temperature	48°C
NBT/ BCIP treatment	25.5 hour

次に、*LePGT-1* の antisense、および sense プローブを用い、proteinase K 濃度を 1.0 µg/ml、hybridization 温度を 53°C、NBT/BCIP 処理を 8 時間として (Table. 1 Exp. 2 参照)、他の条件は初回と同様に *in situ* hybridization を行った (Fig. 4、5)。その結果、proteinase K 濃度を大幅に下げたため、試料の損傷は緩和され、また hybridization 温度を上げることによって sense プローブを用いた hybridization での background を軽減することができた。Antisense プローブを用いた hybridization では、M9 培地中暗黒下で培養した hairy root で表皮細胞全体、およびその内側の皮層細胞でシグナルが確認された。また、M9 培地中光照射下で培養した hairy root を試料とした hybridization の場合、同じ細胞層でシグナルが見られたが、シグナルは暗黒下のものに比べて明らかに弱く、また局所的に確認されただけであった。この結果は、M9 培地において、光照射下で培養した hairy root でも、ある程度の mRNA が検出されたという前述の Northern 解析の結果と矛盾しないものと考えられた。

hairy root cultured in dark



hairy root cultured under continuous light

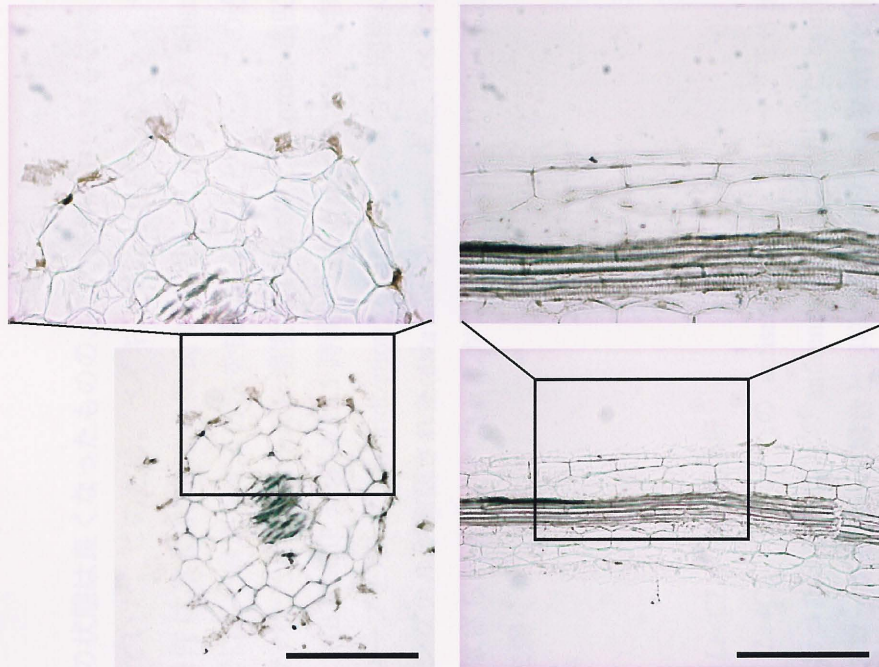


Bars; 500 μ m

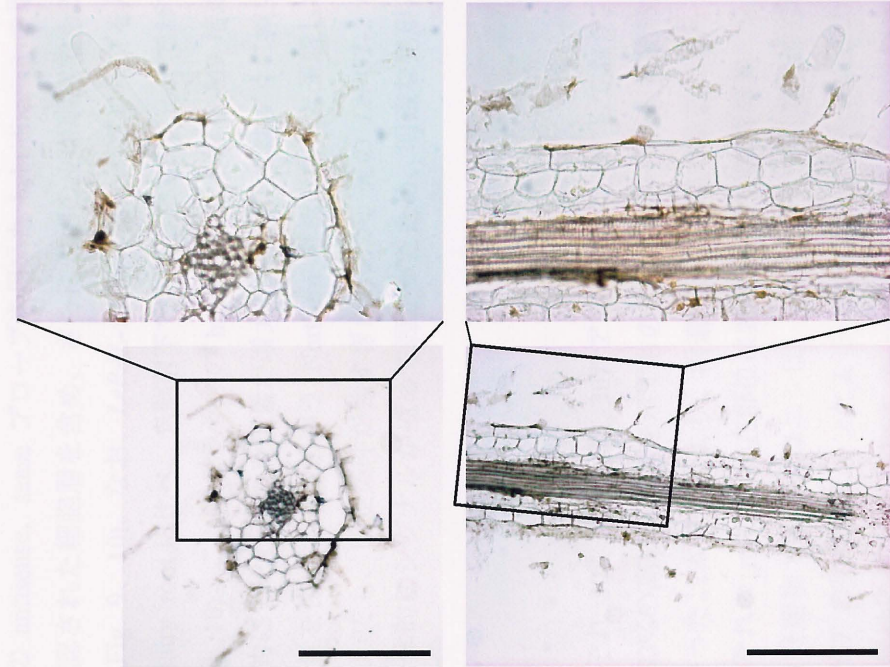
Fig. 5-1 *In situ* hybridization of *LePGT-1* antisense probe

All hairy roots were cultured in M9 medium.
Transversal sections are 25 μ m.
Vertical sections are 20 μ m.

hairy root cultured in dark



hairy root cultured under continuous light



Bars; 500 μ m.

Fig. 5-2 *In situ* hybridization of *LePGT-1* sense probe

All hairy roots were cultured in M9 medium.
Transversal sections are 25 μ m.
Vertical sections are 20 μ m.

条件の再検討により、試料の状態は良くなったものの、この条件においても依然 root hair の欠落など組織の一部は損傷していた。このため、ベイキングにより試料のスライドガラスへの接着を促進し、また固定条件は本研究室の松岡氏が採用した GA/PFA (glutaraldehyde、paraformaldehyde) 固定液で 4°C にて一晩固定する方法を採用することとした。この固定条件は上記の条件に比べて強いものであったため、proteinase K 濃度は 10 µg/ml とし、probe 濃度を 1.2 ng/µl、hybridization 温度を再び 48°C、NBT/BCIP 処理は 25.5 時間とした (Table. 1 Exp. 3 参照)。その結果、*LePGT-1* の antisense プローブを用いた hybridization では、上記の場合と同様に表皮細胞、およびその内側の皮層細胞でシグナルが確認された (data not shown)。また、ベイキング、固定条件の変更により試料の損傷はさらに改善された。しかし逆に、上記より強い固定条件であったためか、シグナルは全体的に弱くなった。

LePGT-2、*LePAL-1*、ならびに *Le4CL-1* の発現解析

LePGT-2、*LePAL-1*、および *Le4CL-1* それぞれの antisense、sense プローブを作成し、上記の条件で *in situ* hybridization を行った。*LePGT-2* の antisense プローブを用いた hybridization において、*LePGT-1* の antisense プローブを用いた場合と同様の発現パターンを示す傾向が認められたが、全体的にシグナルが極めて弱かったため、antisense、sense プローブを用いた hybridization の間で明確な結論を出すには至らなかった (data not shown)。

LePAL-1、および *Le4CL-1* の antisense、sense プローブを用いた hybridization の場合、*LePGT-1*、および-2 のシグナルが確認された細胞層を含め、さらに内側の皮層細胞でもシグナルの発色が認められる傾向があった (Fig. 9、10)。なお、*LePAL-1* の antisense プローブを用いた場合、M9 培地中暗黒下で培養した hairy root に比べ、光照射下で培養した hairy root でわずかながらシグナルが強い傾向を示した (Fig. 10)。これはムラサキの hairy root を新鮮な M9 培地 (暗黒下、および光照射下) に移植後、一過的に *LePAL-1* の発現量が増大し、暗黒下ではすぐに減少する一方、光照射下ではある程度の発現量を保っているという Northern 解析の結果と矛盾しないと考えられた²⁷⁾。しかし、いずれにおいても、固定条件が強すぎたためか、先の *LePGT-2* の場合と同様に切片の状態は良いものの全体的にシグナルが極めて弱かったため、明確な発現パターンは得られなかった。

考察

LePGT-1、および-2 はそれぞれ 306 アミノ酸、307 アミノ酸をコードしており、DNA レベルで 74%、アミノ酸レベルで 93% の高い相同性を示すものの、これらの発現組織特異性に関する知見は今まで得られていなかった。本研究により、両遺伝子は同様の発現パターンを示す傾向にあり、根組織におけるそれぞれの mRNA 局在部位は表皮細胞から皮層細胞の最外層に限られると考えられた。生合成の最終産物であるシコニン、根組織の表皮細胞にのみ特異的に局在しており、これは上記の *LePGT* の発現パターンとよく一致するものである。このことから、本研究はシコニンの局在組織特異性に対する *LePGT* の spacial な遺伝子発現の特異性に関する直接的な証拠を与えるものとなった。また、PAL、および 4CL はシコニン生合成経路上、ゲラニ

ル基受容体の PHB 生合成に関与する酵素である。両遺伝子発現の制御は *LePGT* とは異なり、
光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本
研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らな
かった。

以上の条件に於いて、*LePGT* の発現は、*LePGL* とは異なり、光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らなかった。

LePGT は、*LePGL* とは異なり、光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らなかった。

LePGT は、*LePGL* とは異なり、光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らなかった。

LePGT は、*LePGL* とは異なり、光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らなかった。

LePGT は、*LePGL* とは異なり、光照射下/暗黒下、および LS 培地/M9 培地、いずれの条件においても抑制を受けない^{12) 15)}。本研究では、これら遺伝子の組織特異的発現の解析を試みたが、明確な結論を出すには至らなかった。

ま と め

ムラサキにおけるシコニン生合成の鍵酵素、PHB: グラニルトランスフェラーゼ (GT) は、芳香族環を基質とするプレニルトランスフェラーゼとして植物において、または二次代謝系においてもっともその性質が研究されている酵素のひとつである。しかし植物においては、このような芳香族環-プレニルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニング例は無いため、本酵素の cDNA を単離するにあたって、既にクローニングされている PHB: プレニルトランスフェラーゼ (PHB: PT) である酵母のユビキノン合成系酵素遺伝子 *COQ2* 及びそのホモログを検索し、そのアミノ酸保存配列を利用することにした。すなわち、その配列が植物二次代謝系 PHB: PT にも保存されていることを期待し、プライマーを設計してムラサキの cDNA library をテンプレートに PCR を行った。増幅した断片をランダムにシーケンシングした結果、*COQ2* 遺伝子産物 (*COQ2* 酵素とする) と部分的にアミノ酸配列で 50% の相同性を示すクローンが 2 種類得られた。これらを、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) PHB: Prenyltransferase の意で、LePPT-1、LePPT-2 と仮称した。

これらはおのおの 306、307 アミノ酸からなる蛋白質をコードしており、その相同性は互いに 93% であった。両者ともに高い疎水性を示し、8~9 回膜貫通型の膜蛋白質であると推定された。また Kyte-Doolittle hydropathy plot によると、これらは全体に *COQ2* 酵素のそれと酷似していた。しかし *COQ2* 酵素や、データベースに見られるそのホモログのほとんど全てがミトコンドリア輸送シグナルを N 末端に保有していたのとは対照的に、LePPT にはこの輸送シグナルは見られず ER 局在性と推定された。このことは本クローン 2 種がいずれもユビキノン生合成酵素とは異なることを示唆していた。*COQ2* 酵素と高いアミノ酸相同性を示したのは親水性部分のおそらく反応基質認識部位であると推定される 2 箇所、INDXXD 配列及び GIKSTAL 配列とその周辺部位であった。INDXXD 配列はあらゆるプレニルトランスフェラーゼに共通することから、この周辺配列がプレニル基を認識すること、また GIKSTAL 配列は PHB: PT サブファミリーにのみ共通することから、PHB と何らかの作用があるものと考えられる。

ここで得た LePPT2 種が実際にシコニン生合成に関係する遺伝子であるのかを検定するために、ムラサキ培養細胞における LePPT-1、-2 おおのの発現パターン解析を行い、同時に GT 活性の増減パターン、またはシコニンもしくはエキノフラン類の生産パターンをモニターし、これと比較した。その結果、両 LePPT の発現はいずれも光により強く抑制され、タイムコースもその発現量が最大になった後に、シコニンの生産量が増大するという強い相関性が示された。また、他の因子、アンモニウムイオンや 2,4-D によっても両 LePPT の発現は抑制され、逆にメチルジャスモン酸、酸性多糖によっては発現促進を受けた。このパターンも、モニターした GT 活性の変動および代謝産物量の増減と良く対応していた。また、植物体を用いた Northern 解析により LePPT の発現器官を検定したところ、シコニン生産部位である根部、特に側根に発現が限られていた。これらのことから、LePPT は 1、2 ともにシコニン生合成に関連し、その調節に大きな役割を果たす遺伝子であると結論付けた。様々な因子によるムラサキの GT 活性調節は、翻訳レベルではなく転写レベルで行われていると報告されているが、今回の結果はそれを裏付けるものであった。

以上、LePPT のアミノ酸配列とその発現解析より、本遺伝子はともにシコニン生合成に関わる鍵酵素、PHB: GT であることが推定できた。そこで実際に LePPT を酵母において強制発現させ、その酵素活性を測定してみたところ、酵母の LePPT 形質転換体では主にミクロソーム画分において、ベクターコントロールでは見られない明らかな GT 活性が検出された。このことは、LePPT のコードする蛋白質が実際に、ゲラニル基 (GPP) を PHB のメタ位に転移する活性を有していること、更に、少なくとも酵母においてはミクロソーム画分 (おそらく ER 膜) に局在することが示された。この知見は、ムラサキ培養細胞において GT が ER 膜に局在するというデータと一致している。また、この酵母発現系を用いて LePPT 蛋白質の基質特異性実験も試み、ゲラニル基以外の他のプレニル基も基質として認識するかどうかを確認した。その結果、酵母の内在性 COQ2 酵素は報告されているように広い基質特異性を示し、本来基質とするヘキサプレニル基 (C30) のみならず、C10、C15、C20 の様々なプレニル基に対して活性を示すのに対し、LePPT 蛋白質は C10 のゲラニル基のみを基質とする非常に高い特異性を示した。このことから LePPT 蛋白質は PHB: GT であって、他のプレニル基転移活性を持つものではないことが示された。

以上より、LePPT がシコニン生合成を行う GT をコードしていることが裏付けられ、LePGT と改称することにしたが、LePGT-1 と-2 との差異は、ムラサキにおける発現様式においてもその機能においても明確でなく、若干のアミノ酸配列の違い以上のものは見つけられなかった。この 2 つの酵素の生理的な役割の差異は、より詳細な実験によって今後明らかにされていくと思われる。またゲノムサザン解析によって、LePGT に相同なファミリーメンバーは、この 2 種以外には、あってもあと 1 コピー程度であろうことが推定できた。ただし、今回のスクリーニングでは第 3 の分子種は得られておらず、仮に発現していたとしてもかなり低いレベルであったことが予想できる。

また、本酵素のクローニングの成功により、この遺伝子をムラサキにおいて過剰発現させシコニンの増産を図るという議論については、既に行われている、大腸菌の *ubi A* を植物体に導入して GT の触媒反応を補強するという実験³⁹⁾より、GT の反応産物である GBA が蓄積するだけでシコニン増産には結びつかないであろうことが予想される。シコニン生産量を決定する制御段階は GT の他に、更にその下流にも存在していると思われ、その段階の解明が、遺伝子エンジニアリングによるシコニン増産には必須であろう。

LePGT の上流部分は、植物二次代謝の複雑な調節機構の鍵として興味を持たれることから、inverse PCR 法によりこの部位のクローニングを試みた。結果的には、ゲノムの物理的もしくは化学的切断が原因で十分な長さの上流域が得られず (300bp 程度)、十分なプロモーター解析に繋げることはできなかった。しかし今後、クローニング技術の改良を重ね、更に上流域をクローニングして LePGT の、更にはシコニン生合成の調節機構の全容を明らかにし、二次代謝系の生合成調節機構のモデルを構築できることを期待する。

更に、LePGT はユビキノシン生合成酵素とは対照的に、非常に基質認識に関して特異性が高い。これらが共通のアミノ酸モチーフを持つにも関わらず、このような認識の差異が生ずることは興味深く、基質の特定がどのアミノ酸構造に由来するのかを分子的に解明することは、今後の二次代謝系プレニル化反応の基質改変やエンジニアリングに寄与するものと考えられる。今回確立した LePGT の酵母での発現系は、LePGT をはじめとする酵素遺伝子のポイントミュータシ

オン等の改変効果を検定するために有用であり、今後、この系を用いて PHB:プレニル化酵素の分子的解析を行うことも考えている。

一方、二次代謝産物には、シコニンやカンナビノイドの他、フラボノイドやクマリンなど生合成段階で芳香族環のプレニル化を必要とする化合物が数百種確認されている。これらプレニル化フラボノイドなどは、ファイトアレキシンとして重要な生理的役割を果たしているものも多く、様々な生理活性を有することから天然医薬品としての応用が期待できる化合物も少なくない。しかし、こういった芳香族環のプレニル化を触媒する酵素遺伝子のクローニングは今まで成功しておらず、本研究が最初の報告例となる。こういった意味で本研究が、本来のシコニン生産をエンジニアリングするためのみならず、上述したような多くの代謝産物の生合成酵素同定のためのプローブとして役立つことを期待している。

実験方法

本研究を通じて共通した手法および機器を下に記しておく。本章においては、特筆しない限り以下の方法または機器を用いたものとする。

ムラサキ培養細胞の継代

通常の培養細胞の継代は、Linsmaier and Skoog's (LS) 液体培地 (10^{-6} M IAA、 10^{-5} M kinetin) 30 ml (100 ml フラスコ中) にて行い、暗黒下、90 rpm、25°Cでロータリーシェーカにおいて振とう培養した。2~3 週間に一度、新しい培地に移植した。

大腸菌の形質転換

PCR 産物を pT7-Blue (Novagen) にライゲーションした後、Heat Shock 法により XL1-Blue 株にトランスフォーメーションし、LB (ampicillin 80 μ g/ml) 選択培地にて培養した。

使用機器

- ・微量遠心機 (エッペンドルフチューブ用)
 - 冷却遠心機 : himac CR 15D (HITACHI)
 - 室温遠心機 : himac CT 15D (HITACHI)
- ・冷却遠心機 (ファルコンチューブ用、約 2,000 g まで)
 - Multipurpose Refrigerated Cntrifuge LX-120 (TOMY)
- ・冷却遠心機 (専用遠心チューブ使用、10,000 g 用)
 - Automatic High Speed Refrigerated Centrifuge 20PR-52 (HITACHI)
 - (ローター RPR20-2-903)
- ・超遠心機 (専用遠心管使用、100,000 g 用)
 - Ultracentrifuge TL-100 (BECKMAN)
 - (ローター TLA100.3)
- ・ハイブリダイゼーションオーブン
 - Multi-Shaker Oven HB (TAITEC)
- ・菌用振とう培養器 (37°C 及び 30°C で使用)
 - Soft Incubater SLI-600ND (EYELA)
- ・PCR 用サーマルサイクラー
 - Programmable Thermal Controller PTC-100™ (フナコシ)
- ・HPLC (SHIMAZU)
 - 液体クロマトグラフ : LC-10AD
 - ディテクタ : SPD-M10A
 - システムコントローラー : SCL-10A
 - カラムオーブン : CTO-10AC
 - 解析ソフト : CLASS-VP (LC ワークステーション)

・シーケンス用 kit

Thermo Sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham)

ムラサキにおけるプレニルトランスフェラーゼのクローニング

PCR 法による LePPT クローニング

LePPT のクローニング

Nested PCR に際し、Fw-1~2、Rv-1~5 の 7 種のディジェネレートプライマー、およびアダプタープライマー AP1、AP2 を用いた。この内、結果的に LePPT が得られた PCR のプライマーペアは次の 2 組であった。

(1st PCR) AP1/ Rv-1: 5'-GCIGTDSWYTTTATICC (ATSKIG) -3'

(2nd PCR) AP2/ Rv-2: 5'-TCYTGRTGDGCRATADTGTRTC (DOHAYITD) -3'

program

Marathon cDNA library solv. (×50)	5 μ l	1. 94°C	1 min.
(2nd PCR では 1st PCR mix (×20 dil.)	5 μ l)	2. 92°C	30 sec.
アダプタープライマー	10 pmol	3. -55°C	-1°C/2 sec.
ディジェネレートプライマー	100~150 pmol	4. 37°C	30 sec.
Klen Taq(CLONTECH)	1 μ l	5. +31°C	+1.1°C/2 sec.
Klen Taq buffer	×10	6. 68°C	1.5~2 min.
dNTP mix	10 nmol	7. ×29 to 2 (2nd PCR では×19)	
total	50 μ l	8. 68°C	7 min.
		9. end	

この PCR により、1st PCR では 1.1 kbp 付近、2nd PCR では 0.9 kbp 付近を中心にスメアーなバンドが増幅した (Fig. 2-3/ p. 7 参照)。この増幅断片をランダムにシーケンシングしたところ、COQ2 と相同性を持つ LePPT (0.6 kbp 断片) が得られた。

RACE 法による全配列の決定

LePPT-2 の 5'RACE、および LePPT の 3'RACE に用いたプライマー配列と PCR プログラムは以下の通り。

(LePPT-2 5'RACE) 5'-GCCAACATTTTGGTAGACTGC-3'

(LePPT 3'RACE) 5'-CCCTTTGTGTTTGCTTAYCCTCTC-3'

5'RACE program-()内は 3'RACE

Marathon cDNA library solv. (×50)	5 μ l	1. 94°C	1 min.
アダプタープライマー AP1	15 pmol	2. 94°C	30 sec.

RACE 用プライマー	10 pmol	3. 57°C (60°C)	30 sec.
Advan Taq (CLONTECH)	1 μ l	4. 68°C	40 sec. (1 min.)
Advan Taq buffer	$\times 10$	5. $\times 29$ to 2	
<u>dNTP mix</u>	<u>10 nmol</u>	6. 68°C	5 min.
total	50 μ l	7. end	

LePPT-2 の 5'RACE では約 0.4 kbp に、3'RACE では約 0.8 kbp にシングルバンドが得られた。シーケンシングの結果、5'RACE 産物は目的の LePPT-2 であったが、3'RACE 産物も LePPT-2 だけしか得られなかったため、この PCR 産物に対して LePPT-1 5'RACE 産物でコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、LePPT-1 の 3'RACE 産物が得られた。

LePPT 全長の増幅

LePPT-1、2 の全長を改めてクローニングするために、以下のプライマー配列と PCR プログラムを用いた。

(LePPT-1 Fw) 5'-GCTCTCTTATTATTCTTCCAATTTGGC-3'

(LePPT-1 Rv) 5'-GATGGAAATGGTGACACACACC-3'

(LePPT-2 Fw) 5'-TCATCACATCTCTCAGTTTTCTCTGC-3'

(LePPT-2 Rv) 5'-CGGAAGTATTACTACCAAACAATGGC-3'

		program	
Marathon cDNA library solv. ($\times 100$)	5 μ l	1. 94°C	1 min.
Fw プライマー	50 pmol	2. 94°C	30 sec.
Rv プライマー	50 pmol	3. 46°C	30 sec.
Pfu polymerase (Promega)	2~3 unit	4. 72°C	2 min.
Pfu buffer	$\times 10$	5. $\times 29$ to 2	
<u>dNTP mix</u>	<u>10 nmol</u>	6. 72°C	10 min.
total	50 μ l	7. end	

LePPT-1 は約 1.1 kbp に、LePPT-2 は約 1.2 kbp に強いバンドが増幅し (約 0.6 kbp にも薄いバンドが見られたが)、これが LePPT の全長であることをシーケンシングで確認した。

コロニーハイブリダイゼーション

メンブレンの作成

(試薬)

Denaturate soln. : 0.5 M NaOH、1.5 M NaCl

Neutralize soln. : 1.5 M NaCl、0.5 M Tris-HCl/pH7.5

20 \times SSC : 3 M NaCl、0.3 M クエン酸三ナトリウム二水和物

(方法)

- ・ PCR 産物をエタノール沈殿し、そのまま pT7-Blue (novagen) にサブクローニングして XL1-Blue に Heat Shock 法で導入し、これを plate (9.5cm ϕ) あたり 100~300 コロニー程度の密度に生育させた。
- ・ この上に間に空気が入らないようにナイロンメンブレン(Amersham Hybond N+)を約 1 min 間のせた (この間に注射針で、メンブレンと plate の位置関係の印をつけておく)。
- ・ 菌のついた面を上にして Denaturate soln.に 2 min 湿潤させた。
- ・ さらに Neutralize soln.に 2 min 湿潤させた。
- ・ 2 \times SSC (20 \times SSC を希釈) で軽く洗浄し、ラップで包んで UV-クロスリンカーで 1200 カウントの紫外線を照射し、DNA をメンブレンに固定した。

ハイブリダイゼーション

(試薬)

Hybridize solv. : 1 M NaCl、10% Dextran Sulfate、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、1% SDS、50% Formamide、5 \times Denhardt's solution

100 \times Denhardt's solution : Ficoll 400 10 g、PVP (polyvinylpyrrolodone) 10 g、BSA (fraction V) 10 g/500 ml H₂O

変性サケ精子 DNA

TE (10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA)

(方法)

1) DNA のラベリング (Random Primed DNA Labeling Kit (Behringer Mannheim))

- ・ プローブにする DNA 断片約 50 ng (9 μ l H₂O) を熱変性させた。
- ・ DNA に deoxyATP/GTP/CTP mixture 3 μ l、10 \times reaction mixture 2 μ l、klenow enzyme (exo-) (NEB) 1 μ l、 α -[³²P]-deoxy CTP 5 μ l (1.75 MBq) を加え、37 $^{\circ}$ C で 40 min incubate した。
- ・ 反応液を Quick spin column (Behringer Mannheim) に通して取り込まれなかった α -[³²P]-deoxy CTP を除き、これをプローブとして用いた。

2) ハイブリダイゼーション

- ・ メンブレンを hybridize solv.に浸し、100 μ g/ml となるように熱変性したサケ精子 DNA を加えた。
- ・ ハイブリダイゼーションオープンで 42 $^{\circ}$ C、1 hr 以上 incubate した (prehybridization)。
- ・ ラベリングしたプローブを熱変成させて incubate した hybridize solv.に加え、42 $^{\circ}$ C で更に 12 hr 以上 incubate した (non-stringent の時は 37 $^{\circ}$ C で incubate)。

3) メンブレンの洗浄 (Wash)

- ・メンブレンをタッパーに移し、 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS を加え、 65°C で 20 min 振とう洗浄した (non-stringent の時は $2 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS で 55°C で洗浄)。
- ・上記の洗浄操作をもう一度繰り返した。
- ・メンブレンの水を軽くきり、ラップに包み解析した (BAS2000 (Fuji film)、オートラジオグラフィ等)。

LePPT を得たプライマーペアによる PCR 産物を導入した大腸菌に対してコロニーハイブリダイゼーションを行った結果、約 500 コロニー中 20 個が LePPT プロンプに対してポジティブシグナルを示した。これから 8 個をランダムにシーケンシングしたところ、2 つの分子種に分類できた。

ムラサキにおける LePPT の発現解析

ムラサキ培養細胞のサンプリング

本章の発現解析のサンプリングにあたっては、100 ml フラスコ中の LS または M9 培地 30 ml に 1 g の培養細胞 M18-1 株を移植し、更にその上に 4.5 ml の流動パラフィンを重ねることによって細胞が産出するシコニンなどの代謝産物をこの有機層にトラップすることにした (細胞にシコニンが残っていると、GT 活性測定に大きな障害が出るため)。ただし、3-1 の実験では GT 活性測定を行わないためパラフィンは重層しなかった。培養条件は継代培養と同様である。細胞のサンプリングは、ミラクロスを敷いた目皿漏斗を用いて細胞を吸引濾過し、蒸留水で良く洗浄して培地等を除いてから、生鮮重を測定して液体窒素で凍結保存した。

培地中シコニンの定量

- ・液体培地に 5 ml の n-amyl alcohol を加え、vortex した。
- ・約 100 ml の蒸留水をくわえ、上層の amyl alcohol 層を遠心分離して細胞残滓を除いた。
- ・Amyl alcohol 層 60 μl をエッペンドルフチューブに採り、これに 2.5% KOH 1 ml を加え懸濁、シコニンを抽出した。
- ・これを遠心分離して下層の KOH 溶液 (青色となる) を OD_{620} で測定した。

計算方法

$$(\text{生鮮重あたりのシコニン蓄積量}) = \text{abs} \times 18.7 / (288 \times \text{生鮮重 g}) \times 1.06 / 0.06 \times 5 \quad (\mu\text{mol/g})$$

培地中エキノフラン類の定量

- ・液体培地に 3 ml の hexane を加え、パラフィン層と混合した。
- ・ Hexane/パラフィン層を遠心分離して細胞残滓を除いた。
- ・ Hexane/パラフィン層 5 μ l を直接 HPLC に injection して、分離、定量した。

(HPLC 条件)

HPLC system : SHIMAZU LC-10AD

カラム : LiChrospher 100 RP-18 250 mm \times 4 mm (Merck)

溶媒 : CH₃CN: H₂O: CH₃COOH: (CH₃)₃N = 65: 35: 0.3: 0.3

温度 : 40°C

流速 : 1.5 ml/min.

検出 : 254 nm

保持時間 : (DHEF) 5.3~5.5 min. (EFB) 7.8~8.1 min. (acetyl shikonin) 6.8~7.0 min.

計算方法

エキノフラン類の定量は、HPLC におけるピーク面積(area)を用いて以下の式で算出した。

(DHEF 蓄積量) = $\text{area} \times 4.962 \times 10^{-3} \times 1.5 / (256 \times \text{生鮮重 g})$ ($\mu\text{mol/g}$)

(EFB 蓄積量) = $\text{area} \times 53.819 \times 10^{-3} \times 1.5 / (256 \times \text{生鮮重 g})$ ($\mu\text{mol/g}$)

これらの総和をエキノフラン類蓄積量とした。

ムラサキ培養細胞における GT 活性の測定

粗酵素液の抽出

- ・操作は全て氷上 (4°C) で行った。
- ・サンプリングした培養細胞 1g をあらかじめ 4°C に保存しておいた乳鉢に入れた。
- ・乳鉢に 0.1 M K-Pi Buffer (pH6.5) 3 ml、1 M DTT (Dithiothreitol) 1/100 vol.、PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 約 0.1 g を加え、細胞を 3 min ほど破碎した。
- ・2 重のミラクロスで絞りながら濾過し、濾液を 4°C、10,000 g で 15 min 遠心分離して細胞残滓や核・ミトコンドリア画分を除いた。
- ・上清 2.5 ml を 4°C で、0.1 M Tris-HCl buffer (pH7.5) で飽和した PD-10 カラムに通し、脱塩した。以下全てこれと同じ Tris-HCl buffer を用いた。
- ・Tris-HCl buffer 3.5 ml で溶出した溶出液に 1/100 vol. の 1 M DTT を加えた。
- ・4°C、100,000 g で 40 min 超遠心分離にかけ、膜画分を沈殿させた。
- ・ピペッティングを繰り返して沈殿を 150 μ l の Tris-HCl buffer に懸濁し、1/100 vol. の 1 M DTT を加え、そのうち 85 μ l を粗酵素液として酵素活性測定に、20 μ l を蛋白質定量に用いた。

GT 活性の測定

- ・一反応あたり 85 μ l の粗酵素液を用い、10 mM MgCl₂、1 mM PHB、2 mM GPP (total 100

- μl) として、エッペンドルフチューブ内において 30°C で 1 hr incubate した。
- ・反応停止時に蟻酸 5 μl を加えた。
- ・反応液に、内部標準として 0.5 nmol の testosterone propionate を加え、150 μl の酢酸エチルで有機物を分配抽出した。
- ・窒素ガスを用いて酢酸エチル層を揮発させ、乾燥した酢酸エチル可溶画分を HPLC 用メタノール 10 μl に溶解した。
- ・このメタノール溶液 5 μl を HPLC 用のサンプルとし、以下に示す条件で GBA の検出、定量を行った。

(条件)

HPLC system : SHIMAZU LC-10AD

カラム : LiChrospher 100 RP-18 250 mm × 4 mm (Merck)

溶媒 : CH₃OH: H₂O: CH₃COOH = 80: 20: 0.3

温度 : 40°C

流速 : 1 ml/min.

検出 : 254 nm

保持時間 : 6.1~6.3 min.

計算方法

内部標準である testosterone propionate (TP) での換算を行い、HPLC における反応産物 GBA のピーク面積 (area) から以下の式により、酵素活性を算出した。

$$(\text{GT 活性}) = \text{area}/\text{TP area} \times 120 / (0.138 \times \text{蛋白質量} \times 274 (\text{GBA 分子量})) \quad (\text{nmol/hr} \cdot \text{mg})$$

Northern 解析

Northern メンブレンの作成

(試薬)

20× MOPS : 0.4 M MOPS、0.1 M 酢酸ナトリウム、20 mM EDTA (KOH で pH7.0 に調整)

RNA 泳動バッファー : ホルムアルデヒド 1.6 ml、ホルムアミド 5.0 ml、20×MOPS 0.5 ml、グリセリン色素液 1.6 ml mix

グリセリン色素液 : グリセリン 5 ml、BPB 1 mg、XC 1 mg、0.5 M EDTA (pH8.0) 20 μl、H₂O 4.98 ml mix

(方法)

- ・凍結した培養細胞からの total RNA 及び mRNA の抽出は、第三章で述べた kit により行った。
- ・抽出した RNA 10 μg 相当に RNA 泳動バッファーを適当量 (5~10 μl) 加え、65°C で 10 min 放置した後、氷上で 5 min 冷却した。
- ・RNA サンプルをアガロースゲル (1×MOPS、約 1.3%ゲルにエチジウムブロマイド 0.61/20 ml、ホルムアルデヒドを 1/20 vol.加えたもの) にアブライシ、最初の 5 min は 50V、そ

の後は 100V で電気泳動した。泳動バッファーには 1×MOPS を用いた。

- ・トランスファーバッファーには 20×SSC を用いた。
- ・20×SSC で十分に湿らせた Whatman 3MM 濾紙を 3 枚重ね、その上に気泡が入らないように RNA 泳動ゲルを置いた。
- ・ゲルの上に、気泡に注意してナイロンメンブレン (Amersham Hybond N+) を乗せ、その上に更に 20×SSC に浸しておいた Whatman 3MM 濾紙 3 枚を重ねた。
- ・濾紙の上に十分量のキムタオル、ガラス板、重しをのせ 14~18 hr トランスファーした。
- ・ウェル部に水性色鉛筆 (ファーマー・カステル社の DOCUMENT) で印をつけてからメンブレンを剥がし、2×SSC で軽くゆすいでラップに包み、クロスリンカーで RNA をメンブレンに固定した。
- ・ハイブリダイゼーションの方法は、第二章参照 (stringent な条件)。

プローブ

- ・LePPT-1 のプローブには 5'末端側 680 bp に Marathon kit のアダプター配列がついたものの、LePPT-2 のプローブには 5'末端側 756 bp に同様の配列がついたものを用いた。(これらは RT-PCR におけるプライマー Rv-2 と AP2 の増幅産物である。)

ゲノムサザン解析

Genomic Southern メンブレンの作成

* 本研究室の '99 年度修士卒業生の氏原ともみ氏、学士卒業生の小門善正氏による。

- ・ムラサキ (武田薬品工業京都試験農園産、仙台産) 5 g より、CTAB 法によりゲノムを抽出、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) で精製した。
- ・制限酵素は *EcoR* I、*Hind* III、*EcoR* V (NEB) を用いた。ゲノム 5 μ g 相当に対し各酵素 100 U を用い、total volume 100 μ l で終夜 incubate した。反応後、エタノール沈殿により回収した DNA を 15 μ l の TE buffer に溶解し、ゲルにロードした。
- ・電気泳動は W15 cm、L20 cm、T1 cm の 0.8% アガロースゲルにて行った。上記サンプルをロードした後、30V で 15.5 hr、さらに 40V で 2 hr 泳動し、トランスイルミネーターで DNA の泳動パターンを確認した。
- ・このゲルをタッパーに移し、Denaturate soln. に浸して 1 hr 振とうし、次に液を Neutralize soln. に入れ替え、更に 1 hr 振とうした。
- ・以降のトランスファー及びハイブリダイゼーションの方法は、Northern 解析と同様。

ハイブリダイゼーション条件

ハイブリダイゼーション温度 : 37°C

Wash 温度 : 60°C

Wash 溶液 : 0.2×SSC、0.1%SDS

酵母における LePPT の強制発現および機能解析

大腸菌および酵母発現用 LePPT プラスミドの作成

p-Bluescript SK (-) (大腸菌発現用ベクター) 及び pDR196 (酵母発現用ベクター) の *EcoR* I/*Xho* I サイトを利用して、LePPT-1、-2 の CDS 全長をサブクローニングすることにした。LePPT にはこれらの制限酵素サイトが無かったため、制限酵素サイトを加えたプライマーを設計し、既に第二章で作成した LePPT 全長を鋳型として、PCR により制限酵素サイトを導入した全長を増幅し直した。

pDR196 にサブクローニングするための CDS を増幅するために用いたプライマー配列と PCR プログラムは以下の通り。(下線部；制限酵素サイト、太字；開始コドン)

(LePPT-1 Fw-*EcoR* I) 5'-CGCGAATTCAGAAATGGTTTCCAGCAAACAAAC-3'

(LePPT-1 Rv-*Xho* I) 5'-GCGCTCGAGTGACACACACCATCATACCATAACATAC-3'

(LePPT-2 Fw-*EcoR* I) 5'-CGCGAATTCCTAGAATGAGTTCCAAACAAACACAGC-3'

(LePPT-2 Rv-*Xho* I) 5'-GCGCTCGAGTACTACCAAACAATGGCTTGATAATCC-3'

			program	
2-2 で増幅した全長 LePPT-1 (-2)	0.5 μ g		1. 94°C	1 min.
LePPT-1 (-2) Fw- <i>EcoR</i> I プライマー	100 pmol		2. 94°C	30 sec.
LePPT-1 (-2) Rv- <i>Xho</i> I プライマー	100 pmol		3. 46°C	30 sec.
Pfu polymerase (Promega)	6 unit		4. 72°C	2 min.
Pfu buffer	$\times 10$		5. $\times 29$ to 2	
dNTP mix	20 nmol		6. 72°C	10 min.
total	100 μ l		7. end	

こうして増幅した断片を、*EcoR* I/*Xho* I で処理し、同じく *EcoR* I/*Xho* I で処理した p-Bluescript (大腸菌発現用) 及び pDR196 (酵母発現用) にライゲーションした。

なお、COQ2 を酵母変異株で発現させるための pDP196-COQ2 も作成した。p-Bluescript SK (-) に挿入されていた COQ2 遺伝子の全長 (小門氏作成) を *Sac* I/*Spe* I サイトで切り出し、pDR196 の *Sma* I サイトに *Sac* I リンカーを挿入した上で、その *Sac* I/*Spe* I サイトにサブクローニングした。

酵母 COQ2 欠損株の作成

相同組換えによる COQ2 遺伝子の破壊

(試薬)

YPAD 培地 (1L) : Yeast extract (DIFCO) 10 g、polypeptone (DIFCO) 20 g、glucose 20 g、
Adenin sulfate 40 mg

SD 培地 (1L) : Yeast nitrogen base w/o amino acid (DIFCO) 6.7 g、carbon source、required
amino acid (add after autoclaved ; Leu 60 μ g/ml、 Trp 40 μ g/ml、 His
20 μ g/ml、 Ura 20 μ g/ml)

(方法)

まず、両端に *COQ2* 遺伝子と相同の配列を持つ Genetisin 耐性遺伝子を、遺伝子破壊用ベクター
pUG6 をテンプレートとして PCR によって増幅した。使用したプライマー配列及び PCR 条
件は次の通り。(下線部 ; *COQ2* 遺伝子配列)

(*COQ2*-disrFw) 5'- GTAAGGTTATCAGAAGGGCGGAGTATACTATAGATTACAGTAGAACA
GCTGAAGCTTCGTACGC-3'

(*COQ2*-disrRv) 5'- GCACGCTATATCTACAAGAATCCAAACAGTCTCAAGATGTAGTCGGC
ATAGGCCACTAGTGGATCTG-3'

		program
pUG6	60 ng	1. 94°C 2 min.
<i>COQ2</i> -disrFw プライマー	100 pmol	2. 94°C 15 sec.
<i>COQ2</i> -disrRv プライマー	100 pmol	3. 53°C 30 sec.
PLATINUM Pfx polymerase(GIBCO)	2.5 unit	4. 68°C 2 min.
PLATINUM buffer	×10	5. ×29 to 2
50 mM MgSO ₄	2 μ l	6. 68°C 10 min.
dNTP mix	30 nmol	7. end
total	100 μ l	

その結果、約 1.5 kbp (Genetisin 耐性遺伝子サイズ) の断片がシングルバンドとして増幅でき
た。この 1/3 量を用いて、後述する方法に従って酵母株 W303-1A [*ade2-1/ his2-11,15/ leu2-3,112/*
trp1-1/ ura3-1] にトランスフォーメーションを行った。この酵母を G418 (200 μ g/ml) を加え
た YPAD 培地に拡線し、約 2 日間、30°C で incubate して Genetisin 耐性株を選抜した。しかし酵
母が培地一面に生えたため、これを元に新しい YPAD 培地 (+G418) にレプリカを取り、30°C
で incubate したところ、2 日後に約 20 個のコロニーが生育した。このうち 16 コロニーを選び、
SD (2% glucose) 培地で生育し、SD (3% glycerol) 培地では育たないものを選抜したところ、
15 クローンが *COQ2* 破壊株の phenotype を示した (Fig. 4-3/p. 21 参照)。

酵母からのゲノム抽出及び PCR

(ゲノム抽出法)

- YPAD 培地 10 ml に酵母を移植し、30°Cで飽和するまで incubate した。
- 4°C、1,600 g で 2 min 遠心分離して細胞を沈殿させた。
- 上清を除き、0.5 ml の H₂O に懸濁してエッペンドルフチューブに移した。
- 4°C、10,000 g で 5 sec 遠心し、上清を除いた。
- 1% SDS/ 100 mM NaCl/ 10 mM Tris-HCl (pH8.0) / 1 mM Na₂EDTA 溶液を 0.2 ml 加えた。
- Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) 溶液を 0.2 ml 加えた。
- 硝酸で洗浄したガラスビーズ (φ0.5 mm) を 0.3 g 加えた。
- 4 min vortex し、TE buffer (pH8.0) 0.2 ml を加えた。
- 常温、1,600 g で 5 min 遠心し、水層を新しいチューブに移して 1 ml の 100%エタノールを加え、混合した。
- 4°C、10,000 g で 2 min 遠心し、上清を除いた。
- TE buffer 0.4 ml と RNaseA 溶液 (9 μg 相当) を加えて懸濁し、37°Cで 10 min incubate した。
- 通常のエタノール沈殿を行い、DNA を 1 μg/μl となるように適当量の H₂O に懸濁した。

(PCR による確認)

確認に用いた COQ2 遺伝子用プライマー配列及びプログラムは以下の通り。

(COQ2 full-Fw) 5'-ATCAATCTTCGAGAAAAGGCTAAACGAGCC-3'

(COQ2 full-Rv) 5'-GCGTTGTGAAGAATGACGCCAGGATC-3'

		program	
ゲノム DNA	0.5 μg	1. 94°C	1 min.
COQ2 full-Fw プライマー	50 pmol	2. 94°C	30 sec.
COQ2 full-Rv プライマー	50 pmol	3. 52°C	30 sec.
Ampli Taq (Roche)	5 unit	4. 72°C	1.5 min.
Taq buffer	×10	5. ×29 to 2	
dNTP mix	10 nmol	6. 72°C	5 min.
tota	150 μl	7. end	

この結果、酵母野生株については約 1.5 kbp の、COQ2 欠損株については約 2 kbp の断片が増幅された (Fig. 4-2/p. 21 参照)。

酵母の形質転換 (酢酸リチウム法)

(試薬)

1×TE/LiAc : 10×TE buffer (pH7.5) 1 ml、10×LiAc (pH7.5) 1 ml、H₂O 8 ml

10×TE buffer (pH7.5) : Tris 2.42 g、EDTA・3Na 0.824 g fill up to 200 ml (pH7.5 with HCl)

10×LiAc (pH7.5) : 酢酸リチウム二水和物 2.04 g fill up to 50 ml (pH7.5 with acetic acid)

PEG/LiAc : 10×TE buffer (pH7.5) 1 ml、10×LiAc (pH7.5) 1 ml、50% PEG4000 8 ml

(方法)

- ・ YPAD 培地 5 ml で、酵母 W303-1A 株または *COQ2* 欠損株 (W303- Δ *COQ2*) を前培養した。
- ・ YPAD 培地 50 ml に、 $OD_{600}=0.2\sim0.3$ になるよう前培養液を移植した。
- ・ 菌体濃度が $OD_{600}=1.0\sim2.0$ になるまで培養する。通常 3~5 hr かかる。
- ・ 常温、1,600 g で 5 min 遠心して、沈殿した菌体を 25 ml の H_2O に懸濁した。
- ・ 同条件で再遠心し、菌体を 0.25 ml の 1×TE/LiAc に懸濁する。これをコンピタントセルとした。
- ・ 100 μ l のコンピタントセルにプラスミド DNA 1~10 μ l、熱変成したサケ精子 DNA を 100 μ g、PEG/LiAc 0.7 ml を加え、ピペッティングで懸濁した。
- ・ 30°C で 30 min、シェーカーで incubate した。
- ・ DMSO 94 μ l を加え、ゆっくりと混合した。
- ・ 42°C で 15 min 熱ショックを与え、30 min 室温に放置した。
- ・ 10,000 g で 15 sec 遠心し、集菌して 0.8 ml の H_2O で洗浄した。
- ・ 再遠心して、菌体を 0.4 ml の YPAD 培地に懸濁した。
- ・ 30°C で 3 hr、シェーカーで培養した。
- ・ YPAD (+G418)、SD (-Ura) などの選択培地に払線し、約 2 日、30°C で培養した。

酵母からのプラスミド抽出

(試薬)

酵母溶解液 : 2% TritonX-100、1% SDS、100 mM NaCl、10 mM Tris-HCl (pH8.0)、1 mM EDTA

(方法)

- ・ 2 ml の YPAD 培地で酵母を培養した。
- ・ 1.5 ml をエッペンドルフチューブに移し、10,000 g で 5 sec 遠心した。
- ・ 菌体を 0.2 ml の酵母溶解液に懸濁した。
- ・ Phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1) 溶液を 0.2 ml 加えた。
- ・ 硝酸で洗浄したガラスビーズ ($\phi 0.5$ mm) を 0.3 g 加えた。
- ・ 3~4 min vortex し、10,000 g、室温で 5 min 遠心した。
- ・ 上清を採り、通常のエタノール沈殿を行った。
- ・ DNA を適量の TE buffer に溶解した。

酵母における GT 活性測定

粗酵素液の抽出

(試薬)

100 mM Tris-HCl (pH7.5)

100 mM Tris-SO₄ (pH9.4) : (pH9.4 with H₂SO₄)

1 M K⁺-Pi buffer (pH7.4) : 1 M K₂HPO₄ 200 ml、1 M KH₂PO₄ 50 ml

Solbitol/K⁺-Pi buffer : 1.2 M Solbitol、20 mM K⁺-Pi buffer

Breaking buffer : 0.6 M Solbitol、20 mM Tris-HCl (pH7.4)

(方法)

- YPAD 培地 200 ml (300 ml flask) で 30°C で酵母を培養し、OD₆₀₀=1.5~2.0 にした*¹。
- 培地を 50 ml ファルコンチューブ 4 本に分注し、4°C、2,400 g で 5 min 遠心し、集菌した*²。
- 菌体 0.5 g あたり Tris-SO₄ 5 ml、1M DTT 1/100 vol を加え、30°C で 30 min、90 rpm で振とうした。
- 2,400 g、4°C で 5 min 遠心し、5 ml の Solbitol/K⁺-Pi buffer に懸濁した。
- 上操作を 2 度繰り返した。
- Zymolyase 20-T (生化学工業) 0.5 mg を加え、30°C、90 rpm で、OD₆₀₀ が 1/20 程度に減少するまで (約 1 hr) 振とうした (細胞壁の消化) *³。
- 2,400 g、4°C で 5 min 遠心し、5 ml の Solbitol/K⁺-Pi buffer に懸濁した。
- 上操作を 2 度繰り返した。
- 2,400 g、4°C で 5 min 遠心した後、菌体に Breaking buffer 5 ml、1 M PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride/ in H₂O) 5 μl、1 M DTT を 1/100 vol を加えた。
- 懸濁液をダウンス型破砕器に移し、ピストンを 20 回上下させて細胞を破砕した*⁴。
- 細胞破砕溶液を 50 ml ファルコンチューブに戻して 2,400 g、4°C で 5 min 遠心し、細胞残滓や核を除いた。
- 上清を氷冷しておいた 50 ml 用プラスチック遠心チューブに移して 10,000 g、4°C で 5 min 遠心し、沈殿はミトコンドリア画分として回収した*⁵。
- 上清を 100,000 g、4°C で 1 hr 超遠心し、沈殿を膜画分として回収した。
- ミトコンドリア及び膜画分を 100 mM Tris-HCl (pH7.5) (+1 M DTT 1/100 vol) で 1 度洗浄し、同条件で再遠心して塩類を除去した。
- 各画分を適当量 (200~450 μl) の Tris-HCl (+1 M DTT 1/100 vol) に懸濁し、これを粗酵素液として 1 反応に 85 μl を用いて GT 活性測定を行なった。
- 粗酵素液 20 μl をタンパク質定量に用いた。

注) *¹ • OD は、低すぎると菌量が十分でなく、高すぎるとプロテアーゼにより酵素が分解されるためか、酵素活性が検出できなくなる。

• YPAD 培地への形質転換株の植菌は、必ず SD (- Ura) 培地等で選抜をかけたものから行うこと。YPAD 培地で前培養を行うと、かなりの高頻度でプラスミドが脱落するという結果が出ている。

・培養時間については 16 hr~30 hr まで様々だが、植菌する種の保存期間が長ければ長いほど増殖速度も遅くなるようである。培養時間が 30 hr を超えるようであれば、本実験が失敗する可能性は高い (*5)。

*2 ・一度目の遠心で 4 本のチューブにそれぞれ菌を沈殿させ、上清を少し残して捨て、再び残った培地に懸濁する。この懸濁液を 1 本のチューブに集め、再遠心することで菌を 1 本のチューブに集める。

*3 ・ 50 ml ファルコンチューブをバンドで振とう培養器に固定し、振とうする。

*4 ・ピストンは手で操作する。酵素が失活する恐れがあるため、泡が入らないように注意する。

*5 ・この段階で沈殿が見られないときは実験は失敗である。たとえ上清を超遠心しても、沈殿が得られることはほとんどない。原因は不明だが、最初の培養時間が長すぎた時、植菌の種が古すぎた時に起こることが多い (*1)。

GT 活性測定

活性測定、および反応産物 GBA の検出・定量方法は、第三章における GT 活性測定法と同様である。

基質特異性の検定

粗酵素液の抽出方法は、上述したプロトコルに従った。

活性測定のプレニル基質としては、dimethylallylpyrophosphate (DMAPP-C5)、geranylpyrophosphate (GPP-C10)、farnesylpyrophosphate (FPP-C15/ Sigma)、geranylgeranylpyrophosphate (GGPP-C20/ Sigma) の四種を用い、それぞれに対する酵素活性を比較した。

反応生成物の同定及び定量は RI により BAS2000 で行うため、もう一つの基質である PHB は ^{14}C ラベルされたもの*を用いた。

* p-Hydroxy[ring- ^{14}C]benzoic acid (33 mCi/mmol) (Sigma)

・一反応あたり、10 mM MgCl_2 、400 μM GPP (or DMAPP/ FPP/ GGPP)、24 μM ^{14}C -PHB (80 nCi、3 kBq) とし、粗酵素液 85 μl を加えて total 100 μl でエッペンドルフチューブにて 30°C、1 hr incubate した。(四種の反応に対して同じ粗酵素液を用いるため、反応中の蛋白質量は一定である。)

・蟻酸 5 μl で酵素反応を停止させ、酢酸エチルで有機物を抽出し、ヘリウムガスで乾燥させた。

・10 μl メタノールに溶解させ、全量を TLC プレート (20 cm×20 cm、Kiesel gel 60F₂₅₄、MERCK) にスポットした (スポットは直径 5 mm 程度に抑える)。

・TLC の展開溶媒にはベンゼン: 酢酸エチル=8:2 を 100 ml 用い、展開は溶媒がプレートの上端から 2 cm のところで終了した (約 2 hr.)。

・TLC プレートをよく乾かしてラップで包み、BAS2000 のイメージングプレートに 48 hr

挟んでから解析した。

参考) PHB : Rf= 0.12 GBA : Rf= 0.24 FBA : Rf= 0.28 GGBA : Rf= 0.32

ムラサキ hairy root におけるシコニン生合成遺伝子の組織特異的発現の解析

1-3. 実験材料および方法

ムラサキの hairy root の培養

通常の継代培養は、hairy root を MS 液体培地 30 ml (100 ml 容三角フラスコ) で暗黒下、90 rpm、25°C にてロータリーシェーカーで振とう培養し、1 か月に一度、その一部を新鮮な培地に移植した。また、本研究においてはシコニン生産中の hairy root を用いたが、シコニン生産の誘導は、この MS 培地中の hairy root を M9 培地(暗黒下、および光照射下)に移植することで行った。

ムラサキ hairy root 切片の調製

M9 培地(暗黒下、および光照射下)で培養したムラサキの hairy root をカミソリ刃で約 1cm に切断し、FAE 固定液(4%、および 2%)、または GA / PFA 固定液で固定した後、エタノールで脱水し、ワックス(Paraplast plus、OXFORD)に包埋した。包埋後、メスを用いてフリーハンドで適当な大きさにトリミングし、ミクロトーム(全自動回転式ミクロトーム RM 2155、Leica)で厚さ 20 μ m の縦切り切片、および 25 μ m の輪切り切片を作成した。その後、切片をスライドグラス(スーパーフロスト APS コート付、MATSUNAMI)に滴下した蒸留水の上に乗せ、パラフィン伸展器(HOT PLATE SP-45D、HIRASAWA)上で 42°C にて一晩乾燥した。

DIG ラベル RNA プローブの作成 (*in vitro* transcription)

テンプレートとしては、目的の DNA がサブクローニングされている pBluescript を insert の一端の適当な制限酵素で digest して直鎖状にした後、フェノール・クロロホルム処理、および EtOH 沈殿を行ったものを用いた(Sac など、切断後に 3'末端突出となる制限酵素は不適)。用いた template DNA は Fig. 11 に示した。DIG ラベルした RNA プローブは、DIG RNA Labeling Kit (Roche)を用い、標準プロトコールに従って作成した。また、操作はすべて RNase free で行った。プロトコールは以下の通り。

purified template DNA 1 μ g in sH₂O 13 μ l

-add (on ice) NTP labeling mix 2 μ l

10 \times conc transcription buffer 2 μ l

RNase inhibitor (40 U/ μ l): 1 μ l

T7 or T3 RNA polymerase: 2 μ l (制限酵素処理によりどちらか決定)

- incubate at 37°C 2hr
- add DNase (RNase free) 2 µl
- incubate at 37°C, 15 min
- add 0.2 M EDTA 2 µl (反応停止)
- store at -20°C

反応停止後、size marker とともに電気泳動して反応産物の確認を行った。RNA 濃度は Gene Quant (Pharmacia Biotech)で 260 nm の吸光度を測定することで決定した。

Protocol for *in situ* hybridization

Fixation

- cut the tissue with razor-blade (Feather) as small as 1 cm on a clean filter paper (remove grease using 100% EtOH from the blade before use, and cut as quickly as possible to avoid drying and injuring the tissue)
- transfer into a new 50 ml Falcon tube containing 20-25 ml fresh fixative at 4°C (on ice)
- apply vacuum for a few minutes (small bubbles should be removed from the tissue, but avoid boiling)
- incubate at 4°C(RT) o/n or 3hr

Wax embedding

- remove the fixative with Pasteur pipet (to avoid drying the tissue, remain some solutions)
- 50% EtOH 20-25 ml on ice, 20 min × 2
- 70% EtOH 20-25 ml on ice, 20-30 min
- 80% EtOH 20-25 ml, 20-30 min
- 90% EtOH 20-25 ml, 20-30 min
- 100% EtOH 20-25 ml, 20-30 min
- 1% Eosine-Yellowish in 100% EtOH
- 100% EtOH 20-25 ml, 20-30 min
- EtOH / tBuOH (3:1) 20-25 ml, 30 min
- EtOH / tBuOH (1:1) 20-25 ml, 30 min
- EtOH / tBuOH (1:3) 20-25 ml, 30 min
- tBuOH 20-25 ml at 32°C, 30 min
- Paraplast plus (OXFORD) saturated with tBuOH 20-25 ml at 32°C, 4 hr-o/n
- Paraplast plus saturated with tBuOH 20-25 ml at 45°C, o/n
- Paraplast plus at 60°C, o/n *

Paraplast sections

- cut the tissue embedded in paraplast to trapezoid shaped blocks and mount them on the object holder of the microtome (RM 2155, Leica)
- cut 10-25 μ m thick sections
- transfer ribbons onto a drop of water on the slide glass
- leave slides o/n at 42°C on the heating plate (HOT PLATE SP-45D, HIRASAWA)
- store the sections in a dustfree box at RT up to several months

Dewax (RNase free)

- incubate the slides at 80°C o/n
- xylene, 20 min \times 2
- xylene / EtOH (1:1), 20 min
- 100% EtOH, 20 min \times 2 (//)
- 95% EtOH, 0.85% NaCl in H₂O, 5 min
- 85% EtOH, 0.85% NaCl in H₂O, 5 min (//)
- 70% EtOH, 0.85% NaCl in H₂O, 5 min (//)
- 50% EtOH, 0.85% NaCl in H₂O, 5 min (//)
- 30% EtOH, 0.85% NaCl in H₂O, 5 min (//)
- 0.85% NaCl in H₂O, 5 min (//)
- 0.2 M HCl, 10 min (//)
- H₂O, 10 sec \times 2 (box 2)
- proteinase K (final concentration 1-30 μ g/ml) in 2 \times SSC, 0.1% SDS at 37°C, 5 min (box 3)
- 0.75% glycine in 2 \times SSC, 5 min (box 4)
- 4% formaldehyde in 2 \times SSC, 5 min (box 5)
- 50% formamide in 2 \times SSC, 5 min (box 6)
- 0.85% NaCl in H₂O, 10 sec-1 min (box 7)
- Ac₂O 1 ml in 0.1 M Et₃N (adjusted with conc HCl to pH 8.0), 5 min (box 8)
- add Ac₂O more 1 ml, 5 min
- 0.85% NaCl in H₂O, 10 sec~1 min (box 7)
- 70% EtOH, 5 min (box 8)
- 95% EtOH, 5 min (//)
- 100% EtOH, 5 min (//)

参 考 文 献

- 1) 大塚敬節、矢数道明、清水藤太郎 (1972) 漢方診療医典 p378、南山堂
- 2) 三浦三郎 (1975) 染織と生活 No.11 p9
- 3) 京極和旭、寺山博行、館安英、鈴木堯、小松曼耆 (1973) 生薬誌 27,31
- 4) Tabata M, Tsukada M, Fukui H (1982) *Planta Med* 44, 234
- 5) Hayashi M (1977) *Nippon Yakugaku Zasshi* 73(2), 193
- 6) Yamasaki K, Otake T, Mori H, Morimoto M, Ueba N, Kurokawa Y, Shiota K, Yuge T (1993) *Yakugaku Zasshi* 113, 818
- 7) Hisa T, Kimura Y, Takeda K, Suzuki F, Takigawa M (1998) *Anticancer Res.* 18(2A), 783
- 8) Tabata M, Mizukami H, Hirooka H, Konoshima M (1974) *Phytochemistry* 13, 927
- 9) Fujita Y, Hara Y, Suga C, Morimoto T (1981) *Plant Cell Rep* 1, 61
- 10) Fujita Y, Tabata M, Nishi A, Yamada Y (1982) in *Plant Tissue Culture* 1982 (Fujiwara, A, ed.) p399, Maruzen, Tokyo
- 11) Yazaki K, Takeda K, Tabata M (1997) *Plant Cell Physiol* 38, 776
- 12) Fukui H, Tani M, Tabata M (1990) *Plant Cell Reports* 9:73
- 13) Tani M, Takeda K, Yazaki K, Tabata M (1993) *Phytochemistry* 34, 1285
- 14) Mizukami H, Konoshima M, Tabata M (1977) *Phytochemistry* 16, 1183
- 15) Inoue H, Ueda S, Inoue K, Matsumura H (1979) *Phytochemistry* 18, 1301
- 16) Heide L, Nishioka N, Fukui H, Tabata M (1989) *Phytochemistry* 28, 1873
- 17) Yazaki K, Ogawa A, Tabata M (1995) *Plant Cell Physiol* 36, 1319
- 18) Yazaki K, Inushims K, Kataoka K, Tabata M (1995) *Phytochemistry* 38, 1127
- 19) Bechthold A, Berger U, Heide L (1991) *Arch Biochem Biophys* 288, 39
- 20) Lange B.M, Severin K, Bechthold A, Heide L (1998) *Planta* 204, 234
- 21) Sommer S, Severin K, Camara B, Heide L (1995) *Phytochemistry* 38, 623
- 22) Heide L, Tabata M (1987) *Phytochemistry* 26, 1651
- 23) Yamamoto H, Inoue K, Li SM, Heide L (2000) *Planta* 210(2), 312
- 24) Yamaga Y, Nakanishi K, Fukui H, Tabata M (1993) *Phytochemistry* 32, 633
- 25) Mühlenweg A, Melzer M, Li S, Heide L (1998) *Planta* 425, 0373
- 26) Siebert M, Bechthold A, Melzer M, May U, Berger U, Schroder G, Schroder J, Severin K, Heide L (1992) *FEBS Lett* 307(3), 347
- 27) Suzuki K, Ueda M, Yuasa M, Nakagawa T, Kawamukai M, Matsuda H (1994) *Biosci Biotechnol Biochem* 58(10), 1814
- 28) Ashby MN, Edwards PA (1990) *J Biol Chem* 265(22), 13157
- 29) Ashby MN, Kutsunai SY, Ackerman S, Tzagoloff A, Edwards PA (1992) *J Biol Chem* 267(6), 4128
- 30) Uchida N, Suzuki K, Saiki R, Kainou T, Tanaka K, Matsuda H, Kawamukai M (2000) *J Bacteriol* 182(24), 6933

- 31) Koyama T (1999) *Biosci Biotechnol Biochem* 63(10), 1671 Review
- 32) Yazaki K, Kataoka M, Honda G, Severin K, Heide L (1997) *Biosci Biotechnol Biochem* 61(12), 1995
- 33) Wach A, Brachat A, Dohlmann R, Philippsen P (1994) *Yeast* 10(13), 1793
- 34) Tzagoloff A, Akai A, Needleman RB (1975) *J Biol Chem* 250(20), 8228
- 35) Rentsch D, Laloi M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer WB (1995) *FEBS Lett* 370, 264
- 36) 島本功、佐々木卓治 植物のPCR実験プロトコール 秀潤社 p69, p73
- 37) Boehm R, Sommer S, Li SM, Heide L (2000) *Plant Cell Physiol* 41(8), 911
- 38) 矢崎一史「ムラサキ培養細胞におけるシコニン生合成の中間代謝産物ならびに代謝調節要因に関する研究」(1988) 博士論文(京都大学)

謝 辞

Shikoin derivative formation on the stem of cultured shoots

本研究は、京都大学大学院・生命科学研究科・全能性統御機構学分野・佐藤文彦教授の研究室において行われた。

本研究の遂行にあたっては、本学修士の國久美由紀氏の多大なる協力を得た。また、同修士課程の藤崎隆広氏の協力も研究細部において大いに役に立った。長崎大学山本浩文博士にはムラサキのシコニン誘導に対する新たな知見を提供頂いた。

この他、酵母発現用ベクターを分与頂いた Tuebingen 大学の W. Frommer 教授、キャピラリーシーケンサーの使用を許可頂いた本大学農学研究科天然高分子化学分野の林力丸教授、酵母の遺伝子欠損株作成法を御指導いただいた本研究科微生物細胞機構学分野の玉置尚憲博士、そしてムラサキ植物体を分与下さいました武田薬品工業株式会社および天藤製薬株式会社の皆様に深謝する。

Introduction

Shikoin derivatives are a group of natural products which are derived solely from a single aromatic amino acid, and as an example of secondary metabolites, such as flavonoids, terpenoids (Kawaguchi et al. 1972; Fujita 1988), alkaloids (Yabuchi et al. 1983) as well as the more lipophilic glycosides (Yazaki 1997) have been studied. Recently, hairy root cultures, which is a system for production of shikoin derivatives, have been reported (Shimomura et al. 1991). In order to study the propagation and the secondary metabolite production of *Hydrocotyle*, we have tried to establish hairy root cultures, such as dorsal and adventitious cultures. For the establishment of adventitious root cultures, the shoots were cultured in Knop's nutrient solution (Knop 1932) and Murashige and Skoog's (MS) medium (Murashige and Skoog 1962) as well as in agarose in the dark. The adventitious roots were differentiated from the stem regions during the culture. The newly developed shoots on stems and root system formation was also observed in these stems. The newly developed shoots when subcultured on solid and in liquid MS media without phytohormones, were unable to produce the red pigments. In this paper we describe the production of shikoin derivatives in the cultured shoots, which